

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MARINA DE MAGALHÃES SILVA

**INTERAÇÃO ENTRE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS E ctDNA (Calf
Thymus): UMA ABORDAGEM ESPECTROSCÓPICA**

Maceió – AL
2016

MARINA DE MAGALHÃES SILVA

INTERAÇÃO ENTRE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS E ctDNA (*Calif
Thymus*): UMA ABORDAGEM ESPECTROSCÓPICA

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Isis Martins Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586i Silva, Marina de Magalhães.
Interação entre compostos biologicamente ativos e
ctDNA (*Calf Thymus*) / Marina de Magalhães Silva. – 2016.
142 f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Isis Martins Figueiredo.

Coorientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de
Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Interação molecular. 2. β -carbolinas. 3. Aldiminas. 4. Acridinas.
5. ctDNA (*Calf thymus*). 6. Técnicas espectroscópicas. 7. *Docking*
molecular. I. Título.

CDU:543.422



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

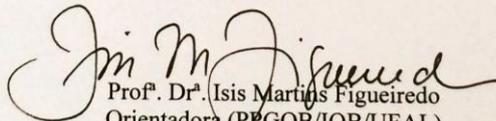


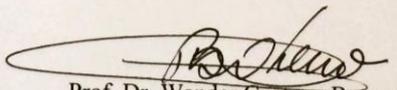
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

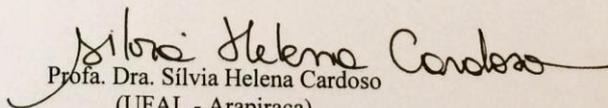
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Marina de Magalhães Silva**, intitulada: **“Interação entre compostos biologicamente ativos e ctDNA (Calf Thymus): uma abordagem espectroscópica”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 25 de fevereiro de 2016, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.ª. Dr.ª. Isis Martins Figueiredo
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
(PPGQB/ UFAL-Arapiraca)


Prof.ª. Dra. Sílvia Helena Cardoso
(UFAL - Arapiraca)

Dedico este trabalho à minha querida mãe Vanda Magalhães, por todo o apoio, carinho, amor, essencial para conquistar mais um sonho, e por me ensinar que na vida haverá muitos obstáculos, mas aquele que tem fé jamais fracassará!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao TODO PODEROSO, JESUS CRISTO, pela saúde, amor e força para vencer os obstáculos durante essa jornada. Por sempre iluminar meus caminhos e me levantar nos momentos em que parecia tudo tão difícil. Muito obrigada por me conceder mais uma vitória!

A minha mãe Vanda Magalhães por ter sido minha companheira tão fiel ao longo desses dois anos, pelas noites que segurou a minha mão, permitindo que nunca me sentisse sozinha. A senhora que foi, é e sempre será meu grande exemplo de vida, minha eterna gratidão! Te amo demais!

Ao meu pai Valmir Correia por todo amor, carinho, torcida e compreensão. Muito obrigada por todo o esforço que fizestes para me educar, mesmo diante de tantas dificuldades!

A minha irmã Mariana Magalhães por todo o carinho, apoio e amor. Jamais se esqueça do quanto és especial em minha vida!

A minha querida e tão amada sobrinha Maria Vitória, que me trouxe alegria para concluir mais uma etapa. Amor inexplicável!

A toda minha família, por sempre acreditar em mim.

Ao meu namorado Genivaldo Filho, por ter me apoiado e compreendido minha ausência durante essa jornada. Obrigada por todo o amor, carinho e paciência!

Aos meus orientadores prof^a Dr^a Isis Martins Figueiredo e ao prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos que além de mestres, foram amigos, apoiando, compreendendo, inspirando e incentivando a trilhar o caminho. Minha eterna gratidão por todo apoio, ajuda, oportunidade, paciência e amizade.

A todos os amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA), por todo o apoio e companheirismo durante esta jornada. Saibam que vocês são muito especiais em minha vida!

Aos meus amigos Rosicleide Viturina, Iza Toledo, Dayanne Dantas, Sarah Kelly, Cláudio Willian, Shenia de Oliveira, Ricardo Costa, Jozenilda (“Nildinha”), por toda a amizade, torcida, amor e carinho durante essa jornada.

Aos professores Maria Helena Sarragiotto, Ângelo de Fátima e Thiago Mendonça de Aquino, por ceder os compostos avaliados nesse trabalho, em especial a professora Maria Helena por ter sido a instigadora para o início desse trabalho!

Ao doutorando Edeílto F. Silva-Júnior pela ajuda na realização dos ensaios de docking molecular.

A prof^a. Dr^a. Anita Marsaioli por ceder o equipamento leitor de microplacas para realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conquista de mais um sonho!

O Senhor disse a Paulo: *“Basta-te a minha graça; pois é na fraqueza que a força se realiza plenamente”*.

Coríntios 1: 25.

RESUMO

O estudo da interação entre DNA com pequenas moléculas, como fármacos, corantes orgânicos e complexos metálicos tem sido muito explorado durante as últimas décadas, visto que essas interações podem levar a compreensão dos mecanismos moleculares de ação dos fármacos contribuindo para a concepção de novos medicamentos DNA-alvo. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a interação de três classes de compostos derivados das β -carbolinas, bases de Schiff (aldiminas) e acridinas com ctDNA (*Calf thymus*), utilizando técnicas espectroscópicas e estudos teóricos, que permitiram avaliar tanto o modo de ligação quanto a magnitude de ligação dos complexos formados com ctDNA, bem como a correlação com suas respectivas atividades biológicas. Assim, de acordo com os resultados obtidos pôde-se observar que os derivados das β -carbolinas e acridinas formaram um complexo supramolecular não fluorescente, caracterizado pelo mecanismo de *quenching* estático. As constantes de ligação (K_b) variaram de $3,30 \times 10^2$ a $1,82 \times 10^6$ L mol⁻¹ para os derivados das β -carbolinas, onde se observou que os alcaloides com o radical *N,N*-dimetilnilina apresentaram maiores valores de K_b ($3,98 \times 10^5$ – $1,82 \times 10^6$ L mol⁻¹). Para os compostos derivados das acridinas verificou-se que os valores de K_b variaram de 2,09 a $7,76 \times 10^3$ L mol⁻¹, seguindo a mesma ordem em relação aos compostos avaliados quanto aos valores das energias de afinidade obtidas por meio dos estudos de *docking* molecular. Para a classe das aldiminas foi observado que os valores de K_b variaram de 0,37 a $3,07 \times 10^5$ L mol⁻¹, sendo os compostos hidroxilados nas posições *orto* e *para*, os que demonstraram maiores valores de constantes de ligação. Adicionalmente, ensaios envolvendo iodeto de potássio, competição com brometo de etídio/acridina orange, estudos de desnaturação térmica e transferência de energia por contato foram realizados a fim de determinar o modo de interação preferencial do complexo DNA-ligante. Estes estudos demonstraram que o mecanismo principal para os derivados β -carbolínicos e acridinas ocorre por intercalação, enquanto para a classe das aldiminas via *groove*. Por fim, uma vez determinados os valores de K_b foi possível estabelecer correlação linear com os valores das atividades biológicas dos compostos avaliados. Ao correlacionar os valores de GI₅₀ ou IC₅₀ das atividades antiproliferativas com os valores de K_b observou-se uma tendência linear inversa para os derivados β -carbolinas e aldiminas (classe 1, somente hidroxiladas), indicando que quanto maior os valores de K_b , menores são os valores de GI₅₀ ou IC₅₀, mostrando-se seletivos para as linhagens de ovário resistente (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03) e próstata (PC-3), enquanto para as aldiminas da classe 2 (contendo radical nitro) obteve-se tendência linear direta para atividade antiproliferativa, onde os valores de K_b e GI₅₀ aumentam proporcionalmente e sendo seletivas para a linhagem de ovário resistente. Além disso, a atividade antimalárica das acridinas foram testadas frente ao *P. falciparum* W2 possibilitando mostrar uma tendência inversa, ou seja, quanto maior o valor da constante de interação com DNA menor o valor de IC₅₀ e da energia de afinidade obtidas através de *docking* molecular. Dessa forma, este conjunto de resultados sugere que o mecanismo de ação dos compostos avaliados tanto para atividade antiproliferativa quanto antimalárica podem estar associados à interação com o DNA como alvo farmacológico.

Palavras-Chave: Interações moleculares. β -carbolinas. Aldiminas. Acridinas. ctDNA (*Calf thymus*). Técnicas espectroscópicas. *Docking* molecular.

ABSTRACT

DNA interactions studies with small molecules such as drugs, organic dyes and metal complexes have been a wide-ranging research theme during the last decades. Since those interactions can lead to a better comprehension at molecular level processes. The elucidation of drug action mechanisms and new drugs conception that are DNA-target designed can be achieved. So, the aim of this work was to evaluate the ctDNA (*Calf thymus*) interaction with three derivative classes of β -carboline, aldimine and acridine compounds, using spectrophotometric techniques and theoretical studies, leading to the evaluation of binding mode and magnitude for the ctDNA/ligand complex, as well as the correlation with their biological activities. According to the results, for the derivative β -carboline and acridine compounds there was formation of a non-fluorescent supramolecular complex, characterized by static quenching mechanism. The binding constants (K_b) ranged from 3.30×10^2 to 1.82×10^6 L mol⁻¹ for β -carboline compounds where it was observed that the alkaloids with the *N,N*-dimethylaniline radical (radical *b*) shown greater K_b values (3.98×10^5 - 1.82×10^6 L mol⁻¹). For the acridine compounds, it was verified that the K_b values ranged from 2.09 to 7.76×10^3 L mol⁻¹, corroborating with predicted energy binding values obtained by the molecular docking studies. For the aldimines compounds, it was observed that the K_b values ranged from 0.37 to 3.07×10^5 L mol⁻¹, being the hydroxylated compounds (*orto* and *para* positions) the ones with greatest K_b values. Additionally, the potassium iodide and competition with ethidium bromide assays, thermal denaturation profile and contact energy transfer were executed to determine the preferential binding mode of the DNA-ligand complexes. These studies have shown that the preferential binding mode for the derivate β -carboline and acridine compounds occur by intercalation, while that for aldimine compounds were preferentially by groove. Furthermore, once the K_b values were determined, the linear correlation for the biological activities of the evaluated compounds was established. An inverse linear profile for β -carboline, acridine compounds and a few derivative aldimine compounds (class 1, only hydroxyl substituted), indicating that the greater K_b values, smaller are the GI₅₀ or IC₅₀, being selective for resistant ovarian (NCI-ADR/RES), ovarian (OVCAR-03) and prostate (PC-3) cell lines, while class 2 aldimine compounds (radical nitro substituted) had a direct linear trend for anti-proliferative activity, where the K_b and GI₅₀ values increase proportionally, being selective to resistant ovarian cell lines. Moreover, the anti-malaria activity for acridine compounds was evaluated towards *P. falciparum* W2, showing an inverse profile; that is, the greater the K_b values the smaller IC₅₀ and binding energy obtained by molecular docking. In conclusion, the set of results suggests that the mechanism of action for the evaluated compounds in both anti-proliferative and anti-malaria activity can be associated with the DNA interaction as a pharmacological target.

Keywords: Molecular interactions. β -carbolines. Aldimines. Acridines. ctDNA. Spectroscopic techniques. Molecular *docking*.

LISTA DE ESQUEMAS

Seção 3 – Artigo 1

Esquema 1 – Compostos β -carbolínicos selecionados que foram sintetizados pelo grupo de Produtos Naturais Estrutura, Conformação e Atividade Biológica (UEM) e respectivas atividades biológicas.....	69
Esquema 2 – Estruturas dos compostos β -carbolínicos avaliados.....	71

Seção 4 – Artigo 2

Esquema 1 – Estrutura das bases de Schiff avaliadas.....	93
Esquema 2 – Relação de trabalhos com moléculas estruturalmente similares às bases de Schiff avaliadas e alguns dados em relação à interação com DNA.....	102

Seção 5 – Artigo 3

Esquema 1 – Estrutura das acridina avaliadas.....	114
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Seção 1 – Introdução Geral

Figura 1 – Estrutura do DNA e formação dos pares de bases AT e CG, por meio de ligações de hidrogênio.....	19
Figura 2 – Comparação das conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA.....	20
Figura 3 – Estruturas do DNA de três e quatro fitas.....	21
Figura 4 – Modelos genéricos de modos de ligação de compostos com DNA.....	22
Figura 5 – Estruturas de núcleos clássicos que interagem via intercalação.....	24
Figura 6 – Estruturas de ligantes que interagem preferencialmente via <i>groove</i>	25
Figura 7 – a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias; b) Mecanismo de resistência do DNA a fármacos em função de processos de mutação.....	27
Figura 8 – Perfil espectral do DNA em função da temperatura.....	33
Figura 9 – Representação do processo de <i>quenching</i> dinâmico ou colisional.....	36
Figura 10 – Representação do processo de <i>quenching</i> estático.....	36
Figura 11 – Compostos utilizados no tratamento do câncer.....	44
Figura 12 – Agentes antimaláricos.....	46
Figura 13 – Fármacos usados na terapia da fase aguda da doença de Chagas.....	47

Seção 3 – Artigo 1 (Derivados β -carbolínicos)

Figura 1 – Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular.....	73
Figura 2 – Espectro de absorção do composto 3b (10 μ M), ctDNA (100 μ M) e 3b-ctDNA..	75
Figura 3 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante.....	77
Figura 4 – Curva de desnaturação térmica do ctDNA a 260 nm na ausência e na presença do composto.....	79
Figura 5 – Gráfico de correlação linear do IC_{50} (μ M) vs $\log K_b$ a 95% de intervalo de confiança.....	81
Figura 6 – Estruturas moleculares ancoradas dos derivados β -carbolínicos complexadas com o DNA.....	83

Figura 7 – <i>Docking</i> molecular do composto 3b mostrando significativas ligações de hidrogênio (pontos verdes) e interações hidrofóbicas (esferas cinzas) com DNA.....	84
--	----

Seção 4 – Artigo 2 (Aldiminas)

Figura 1 – Moléculas contendo grupo imina (em azul) que apresentam potente atividade biológica frente a diferentes patologias.....	90
Figura 2 – Fármacos antineoplásicos contendo similaridade com as aldiminas a) citarabina b) capecitabina.....	91
Figura 3 – Espectro UV do ctDNA e das bases de Schiff 3 e 8 (10 μ M) na ausência e na presença de ctDNA (60 μ M).....	94
Figura 4 – Perfis espectrais das bases de Schiff.....	95
Figura 5 – <i>Quenching</i> das bases de Schiff.....	100
Figura 6 – Gráfico da correlação linear de GI_{50} (μ g mL ⁻¹) vs $\log K_b$ a 95% de intervalo de confiança.....	106

Seção 5 – Artigo 3 (Acridinas)

Figura 1 – Acridinas que apresentam potente atividade biológica frente a diferentes patologias.....	111
Figura 2 – Resultados obtidos para a avaliação da interação DNA-ligante.....	115
Figura 3 – Derivados de acridinas e suas respectivas constantes de ligação com o DNA... ..	117
Figura 4 – Espectro de absorção do composto ACS-Az01 (10 μ M) e ACS-AZ01-ctDNA. ..	119
Figura 5 – Valores de K_{SV} das acridinas (5,0 μ M) por meio do quenching do KI na ausência e presença de ctDNA (50 μ M).....	120
Figura 6 – Resultados referentes ao ensaio de transferência de energia por contato.....	122
Figura 7 – Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema AO-DNA por competição do composto ACS-Az01.....	123
Figura 8 – <i>Docking</i> das estruturas moleculares dos derivados complexadas com o DNA.....	124
Figura 9 – <i>Docking</i> molecular do composto ACS-Az01 mostrando as interações hidrofóbicas (esferas cinzas) com DNA.....	125

Figura 10 – Gráfico de correlação linear do IC_{50} (μM) vs K_b ($L mol^{-1}$) e energia de afinidade ($kcal mol^{-1}$) vs K_b ($L mol^{-1}$), respectivamente, a 95% de intervalo de confiança (linhas verdes e azuis)..... 127

LISTA DE TABELAS

Seção 1 – Introdução Geral

Tabela 1 – Informações, parâmetros e comentários gerais sobre as principais técnicas para avaliação da formação do complexo DNA-ligante.....	29
Tabela 2 – Principais equações para calcular a constante de ligação (K_b).....	38
Tabela 3 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil.....	42

Seção 2 – Experimental

Tabela 1 – Concentrações utilizadas nos ensaios realizados para cada classe de compostos avaliada.....	64
--	----

Seção 3 – Artigo 1 (Derivados β -carbolínicos)

Tabela 1 – Parâmetros de interação do ctDNA com os compostos β -carbolínicos.....	73
Tabela 2 – Valores de absorvância para os compostos β -carbolínicos avaliados (10 μ M), ctDNA (100 μ M) e composto-ctDNA.....	76
Tabela 3 – Parâmetros relativos ao deslocamento do brometo de etídio por ensaio de competição do complexo BE-DNA com compostos β -carbolínicos (120 μ M) avaliados.....	78
Tabela 4 – Resultados referentes ao estudo de desnaturação térmica do ctDNA frente aos compostos selecionados.....	79

Seção 4 – Artigo 2 (Aldiminas)

Tabela 1 – Valores das absorvâncias das bases de Schiff avaliadas (10 μ M), ctDNA (60 μ M) e o complexo formado (composto-ctDNA) a 30 °C.....	94
Tabela 2 – Parâmetros de ligação e termodinâmicos relativo à interação das bases de Schiff avaliadas com o ctDNA (38°C).....	97
Tabela 3 – Avaliação do modo de ligação das bases de Schiff com o ctDNA por efeito do quencher KI e equilíbrio de competição com o brometo de etídio (BE).....	100

Tabela 4 – Atividade citotóxica (GI_{50}^a , em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e índice de seletividade (IS^b ; dados entre parênteses) das bases de Schiff avaliadas frente a diferentes linhagens celulares.....	104
Tabela 5 – Correlação linear entre as constantes de ligação das bases de Schiff (38°C) com o ctDNA e atividade citotóxica (GI_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$), frente a diferentes linhagens celulares.....	105

Seção 5 – Artigo 3 (Acridinas)

Tabela 1 – Parâmetros de interação do ctDNA com os derivados de acridinas.....	116
Tabela 2 – Parâmetros de ligação por UV-Vis e valores de absorvância para os derivados de acridina avaliados ($10\ \mu\text{M}$), ctDNA ($100\ \mu\text{M}$) e composto-ctDNA.....	119
Tabela 3 – Parâmetros do equilíbrio de competição AO-DNA com os derivados de acridinas ($20\ \mu\text{M}$) avaliados ($30\ ^\circ\text{C}$).....	123
Tabela 4 – Energias de ligação dos derivados de acridinas com DNA.....	124
Tabela 5 – Resultados dos ensaios biológicos.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AO	Acridina orange
BE	Brometo de etídio
C	Citosina
CIM	Concentração Inibitória mínima
ctDNA	DNA <i>Calf Thymus</i>
DC	Dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSY	Diffusion-Ordered Spectroscopy
F	Fluorescência
G	Guanina
GI ₅₀	Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento
IC ₅₀	Concentração mínima do fármaco capaz de produzir citotoxicidade de 50% da cultura celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
K _b	Constante de ligação
K _{SV}	Constante de Stern Volmer
MFA	Microscopia de força atômica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
T	Timina
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	
1.1	Química supamolecular	18
1.2	DNA: características gerais	18
1.2.1	DNA duplex.....	18
1.2.2	DNA triplex e quadruplex.....	20
1.2.3	Modo de ligação DNA-ligante.....	22
1.2.3.1	Modo de ligação covalente.....	22
1.2.3.2	Modo de ligação não covalente.....	23
1.3	Importância de estudos de interação DNA-ligante	25
1.4	Técnicas empregadas para o estudo da interação DNA-ligante <i>in vitro</i>	28
1.4.1	Espectroscopia no UV-visível.....	31
1.4.1.1	Estudos de desnaturação térmica.....	33
1.4.2	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	34
1.4.2.1	Mecanismo de <i>quenching</i>	35
1.4.2.2	Constantes de ligação (K_b).....	37
1.4.2.3	Modo de ligação.....	38
1.4.2.3.1	Ensaio com iodeto de potássio (KI).....	39
1.4.2.3.2	Ensaio de competição.....	39
1.4.2.4	Parâmetros termodinâmicos.....	40
1.5	Patologias tendo como alvo biológico o DNA	41
1.5.1	O câncer.....	41
1.5.1.1	Estimativa sobre a incidência de câncer no Brasil.....	42
1.5.1.2	Tipos de tratamento do câncer.....	43
1.5.2	A malária.....	45
1.5.3	Doença de Chagas.....	47
1.5.4	Leishmaniose.....	48
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVO GERAL DO ESTUDO PROPOSTO	50
	REFERÊNCIAS	51
2	EXPERIMENTAL	
2.1	Reagentes e Soluções	59
2.2	Equipamentos utilizados	59

2.3	Procedimentos	60
2.3.1	Determinação da concentração do ctDNA (<i>Calf thymus</i>).....	61
2.3.2	Interação ctDNA-ligante por fluorescência.....	61
2.3.3	Estudo realizado com iodeto de potássio (KI).....	61
2.3.4	Ensaio de competição com brometo de etídio (BE) e acridina orange (AO).....	61
2.3.5	Avaliação da temperatura de desnaturação.....	62
2.3.6	Avaliação da transferência de energia por contato.....	62
2.3.7	Ensaio biológico.....	62
2.3.8	Tratamento dos dados.....	63
2.4	Docking molecular	65
	REFERÊNCIAS	67
3	ARTIGO 1: DERIVADOS β-CARBOLÍNICOS	
3.1	Introdução	68
3.2	Objetivos Específicos	70
3.3	Resultados e Discussão	71
3.3.1	Considerações iniciais.....	71
3.3.2	Avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular.....	71
3.3.3	Estudos por UV-Vis: avaliação do mecanismo de <i>quenching</i>	75
3.3.4	Avaliação do modo de ligação composto-ctDNA.....	76
3.3.5	Análise de correlação.....	80
3.3.6	Estudos de <i>docking</i> molecular.....	82
3.4	Conclusão	84
	REFERÊNCIAS	86
4	ARTIGO 2: ALDIMINAS	
4.1	Introdução	90
4.2	Objetivos Específicos	92
4.3	Resultados e Discussão	93
4.3.1	Considerações iniciais.....	93
4.3.2	Estudos por UV-Vis: avaliação sobre formação de complexo DNA-ligante.....	93
4.3.3	Estudos por fluorescência molecular.....	95
4.3.3.1	Parâmetros Termodinâmicos.....	99
4.3.4	Avaliação do modo de ligação.....	99
4.3.5	Análise de correlação.....	103
4.4	Conclusão	106

	REFERÊNCIAS.....	108
5	ARTIGO 3: ACRIDINAS	
5.1	Introdução.....	111
5.2	Objetivos Específicos.....	113
5.3	Resultados e Discussão.....	114
5.3.1	Considerações iniciais.....	114
5.3.2	Avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular.....	114
5.3.3	Estudos por UV-Vis: avaliação do mecanismo de <i>quenching</i>	118
5.3.4	Avaliação do modo de ligação composto-ctDNA.....	120
5.3.4.1	Ensaio iodeto de potássio (KI).....	120
5.3.4.2	Transferência de energia por contato.....	121
5.3.4.3	Ensaio de competição com acridina orange (AO).....	122
5.3.5	Estudos por <i>docking</i> molecular.....	124
5.3.6	Análise de correlação.....	125
5.4	Conclusão.....	128
	REFERÊNCIAS.....	130
6	CONCLUSÃO GERAL.....	133
7	PERSPECTIVAS.....	134
8	ARTIGOS	
8.1	Publicados.....	135
8.2	In Press.....	137
9	Premiações.....	138

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Química supramolecular

O conceito moderno de química supramolecular foi introduzido pelo químico francês Jean-Marie Lehn em 1978. Ele foi o pioneiro e conceituou química supramolecular como sendo a “química além da molécula”. Enquanto a química molecular estabelece sua base pautada na ligação covalente, a química supramolecular está fundamentada num domínio científico interdisciplinar que engloba características químicas, físicas e biológicas de espécies químicas de maior complexidade que as moléculas simples, ligadas entre si e (auto) organizadas por ligações intermoleculares (não covalentes) (BAZZICALUPI, et al., 2014). Assim, a química supramolecular se baliza em um grau de complexidade superior, para além da molécula, denominado de supermolécula(s) e sistemas polimoleculares organizados, mantidos por interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras. Tais interações são de fundamental importância nos processos biológicos entre substratos e proteínas receptoras, reações enzimáticas, reconhecimento celular, regulação da expressão genética pelas proteínas ligadas ao DNA e, sobretudo a interação de DNA e fármacos (LEHN, 1996).

1.2 DNA: características gerais

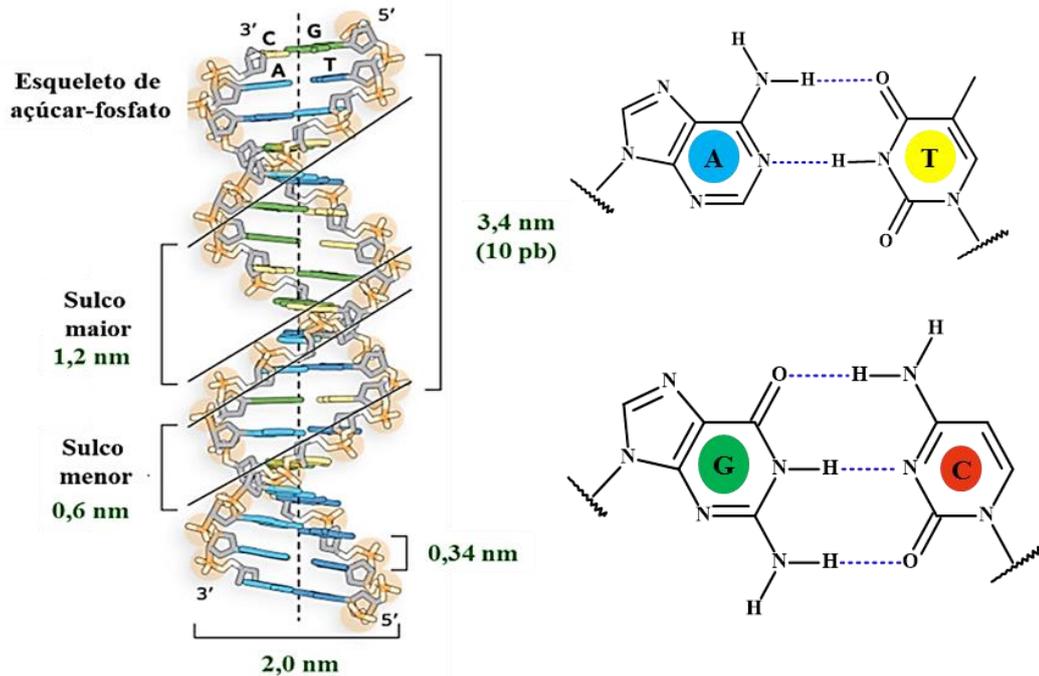
1.2.1 DNA duplex

A estrutura tridimensional do DNA (ácido desoxirribonucleico) foi proposta em 1953 pelos cientistas James Dewey Watson e Francis Crick, caracterizando um dos principais marcos na história da biologia moderna, uma vez que possibilitou o conhecimento atual sobre o fato do DNA celular conter tanto a informação genética como às características e funções de cada célula. (NELSON; COX, 2011).

O modelo proposto por Watson e Crick consiste em duas cadeias helicoidais de DNA que se entrelaçam em um mesmo eixo formando uma dupla hélice. O esqueleto hidrofílico dos grupos alternantes desoxirribose e fosfatos carregados negativamente se encontram na parte externa da dupla fita interagindo com a água circundante (Figura 1); e as bases purínicas e pirimidínicas de ambas as fitas estão empilhadas no interior da dupla hélice (NELSON; COX, 2011; THIEMANN, 2003). Cada fita é composta por uma combinação de quatro nucleotídeos (ligados a desoxirribose) que se mantêm unidos por ligação fosfodiéster, sendo as bases: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). A adenina (A) de uma fita sempre forma duas ligações de hidrogênio com a timina (T) da outra, enquanto a guanina (G)

forma três ligações de hidrogênio com a citosina (C) da fita complementar (Figura 1). Assim, ao longo da hélice, os pares de bases são sempre AT (ou TA) e CG (ou GC) (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008).

Figura 1- Estrutura do DNA e formação dos pares de bases AT e CG, por meio de ligações de hidrogênio.

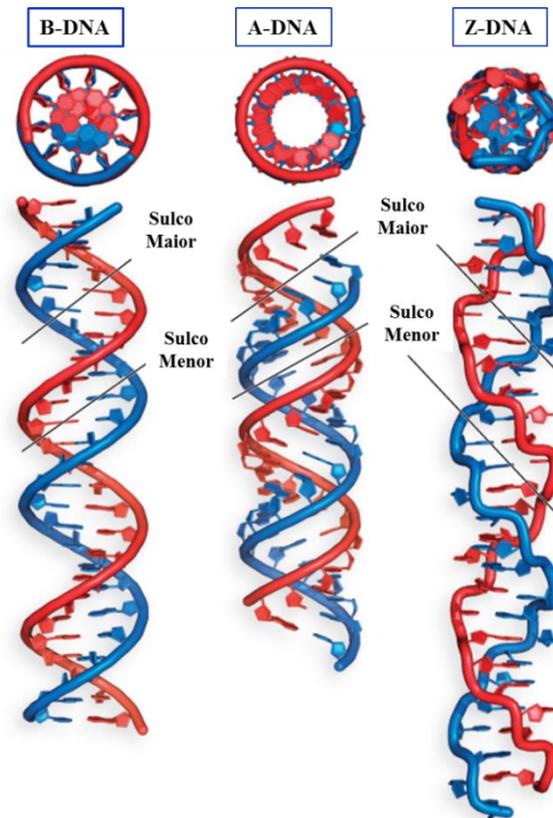


Fonte: adaptado de ALMEIDA et al., 2005.

As duas cadeias polinucleotídicas (fitas) do DNA são antiparalelas e distintas quanto à composição e sequência de bases. Essas cadeias são complementares entre si, isto é, quando se tem adenina em uma cadeia, timina será a base complementar na outra fita, e o mesmo ocorre para citosina e guanina. A dupla hélice do DNA é mantida unida por ligações de hidrogênio entre as bases (complementaridade) e as interações de empilhamento, as quais contribuem para estabilidade da dupla fita. Devido a essa complementaridade, torna-se possível o processo de replicação, onde cada fita preexistente pode funcionar como um molde para guiar a síntese de uma fita complementar (NELSON; COX, 2011; GARRETT; GRISHAM, 2012; MEYERS, 2002).

O DNA duplex também apresenta variações estruturais (isoformas) dependentes do meio onde se encontra, podendo assumir três conformações: A-DNA, B-DNA E Z-DNA (Figura 2).

Figura 2- Comparação das conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA.



Fonte: adaptado de COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL, 2012.

A estrutura proposta por Watson e Crick, refere-se à forma B do DNA, que por sua vez, é a estrutura mais estável (11 pares de bases para uma volta completa na hélice) e a forma fisiológica mais encontrada (em solução), onde as interações com as bases nitrogenadas promovem a formação da dupla hélice com rotação para a direita. Além disso, também é considerada padrão de referência em qualquer estudo das propriedades do DNA (HARVEY; FERRIER, 2011). A isoforma A-DNA é mais curta e possui maior diâmetro em relação ao centro (10 pares de bases para uma volta completa na hélice), está presente em ambientes com baixa concentração de água (com alto teor de solvente orgânico, por exemplo). Enquanto que a forma Z-DNA é a conformação alongada e fina (12 pares de bases para uma volta completa na hélice), possui a rotação da hélice para a esquerda e o DNA assume essa conformação em meios com alta concentração de cátions (elevada força iônica) (ALMEIDA, 2005).

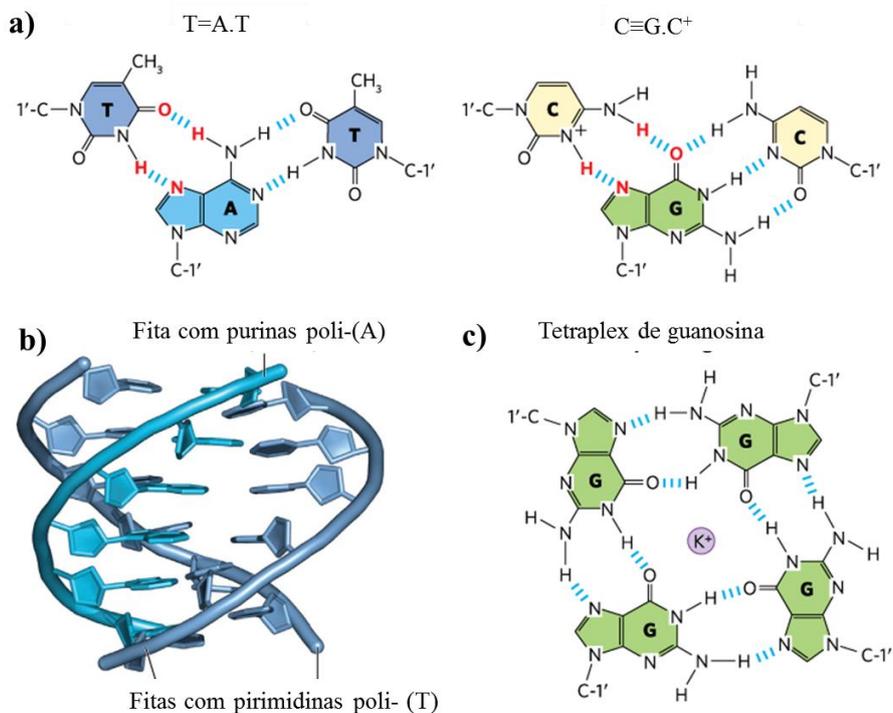
1.2.2 DNA triplex e quadruplex

Segundo Cox e colaboradores (2012), além dessas conformações, diversas estruturas de DNA não usuais envolvem três ou até mesmo quatro fitas de DNA. Essas variantes estruturais são importantes, porque há uma tendência de serem formadas nos processos de

replicação, recombinação e transcrição. O DNA triplex constitui uma dessas estruturas incomuns, e é formado de maneira mais rápida em sequências longas contendo apenas pirimidinas ou apenas purinas em determinada fita, porém alguns contêm duas fitas de pirimidinas e uma de purinas, e vice-versa. Essa formação de hélices triplas é permitida pelo pareamento de Hoogsteen (não Watson-Crick), que consiste na possibilidade de formar ligações de hidrogênio adicionais (Figura 3a), por exemplo, uma timidina pode parear com uma adenosina de um par A=T, assim como uma citidina (se estiver protonada) pode parear com uma guanosina de um par C≡G, formando “bases triplas”.

Além disso, quatro fitas de DNA podem se associar formando um quadruplex (Figura 3b), porém isso só ocorre em sequências ricas em resíduos de guaninas. Essa alta proporção de guaninas, leva à formação de estruturas de quatro cadeias organizadas como um arranjo em quadrado de guaninas (também denominado tetrada), que são estabilizadas por ligações de hidrogênio e pela existência de cátions monovalentes (K^+ , por exemplo) no centro dessas tetradas (Figura 3c) (BHADRA; KUMAR, 2011).

Figura 3- Estruturas do DNA de três e quatro fitas. a) Pareamento de bases no triplex de DNA; b) Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas com poli- (T) e uma com poli- (A); c) Uma camada de estrutura de tetraplex de guanosina.



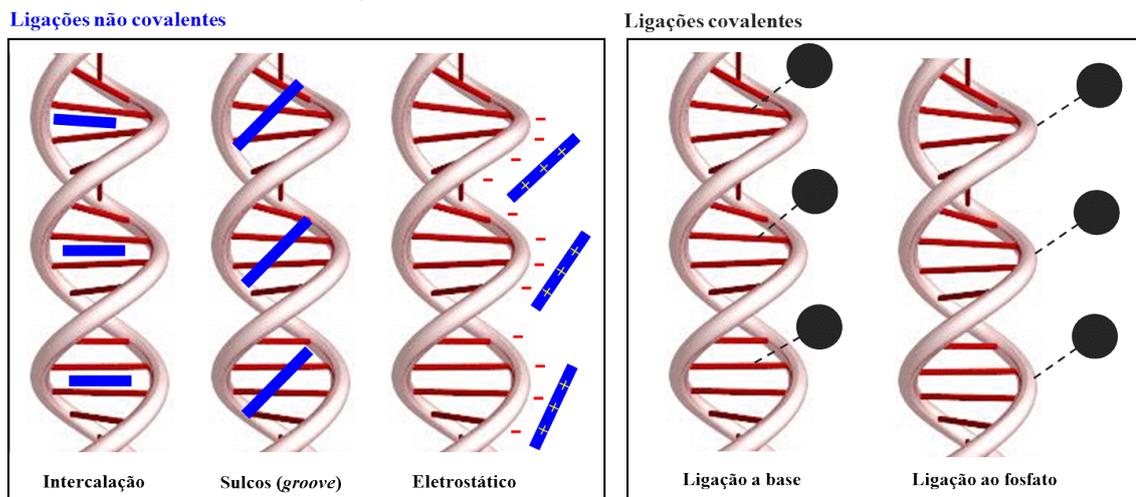
Fonte: adaptado de COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL, 2012.

Assim, por estarem envolvidas em alguns processos biológicos, sobretudo na expressão gênica associada à doença humana (MORIYAMA, IWASAKI, MIYOSHI, 2015), a avaliação de processos de interação dessas conformações de ácido nucleico (triplex e G-quadruplex) com compostos orgânicos ou inorgânicos têm sido utilizadas como uma abordagem terapêutica alternativa para o tratamento de câncer (FOX, 2000; SIDDIQUI-JAIN, et al., 2002; BALASUBRAMANIAN; NEIDLE, 2009; MA, et al., 2011).

1.2.3 Modo de ligação DNA-ligante

O DNA pode interagir com diversas espécies ou compostos de duas maneiras: pelo modo de ligação covalente, através da ligação direta ligante-DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; e não covalente através de interações eletrostáticas, interações nos sulcos (*groove*) do DNA, ou através da intercalação (Figura 4) (BARRA; NETTO, 2015).

Figura 4- Modelos genéricos de modos de ligação de compostos com DNA. Aspectos relacionados à estequiometria não foram considerados na concepção da figura, apenas às regiões preferenciais e modos de interação com DNA.



Fonte: adaptado de BARRA; NETTO, 2015.

1.2.3.1 Modo de ligação covalente

O modo de ligação covalente do DNA com pequenas moléculas é irreversível e provoca a inibição completa do DNA com conseqüente morte celular. A ligação covalente apresenta uma elevada resistência, o que pode causar distorção na molécula de DNA, e por sua vez afetar o processo de transcrição e replicação. Um exemplo de um composto que forma ligação covalente com DNA é a cisplatina [*cis*-diclorodiaminoplatina(II)], um tradicional ligante, capaz de realizar ligações covalentes com os nitrogênios das bases do DNA deslocando o cloreto. De modo semelhante, os agentes alquilantes formam ligações covalentes com o DNA, impedindo e/ou inibindo o ciclo celular (processos de replicação).

Estes também podem fazer a substituição em outra molécula, de um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Os agentes alquilantes têm sido utilizados em atividade antitumoral (por exemplo, a ciclofosfamida, o bussulfam e as nitrosuréias), pois se ligam ao DNA de forma a impedir a separação das duas fitas da dupla hélice (PUYO, MONTAUDON, POURQUIER, 2014).

1.2.3.2 Modo de ligação não covalente

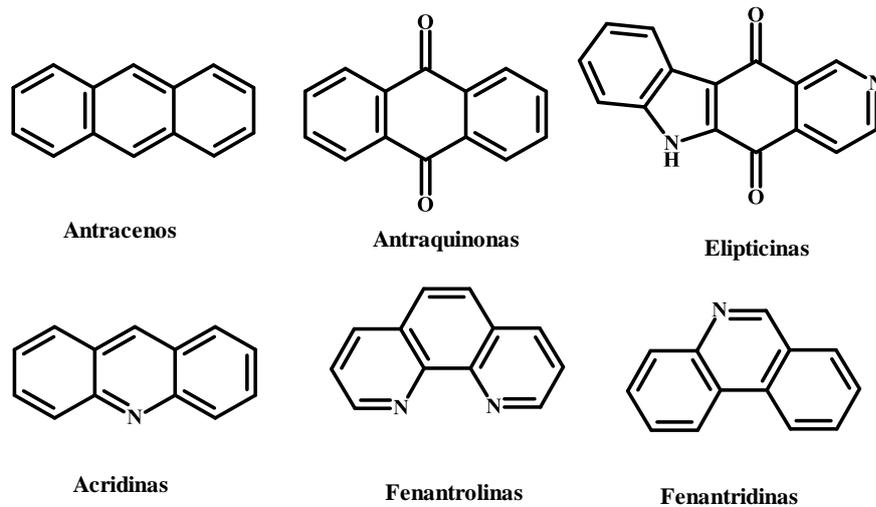
O modo de ligação não covalente é reversível, e a espécie ou molécula alvo ao interagir com o DNA pode alterar a conformação, provocar tensão torsional e interromper/inibir o processo de interação DNA-proteína nos processos biológicos (SILVESTRI; BRODBELT, 2012). Existem três formas de interações reversíveis entre o DNA e ligantes:

a) Intercalação: ocorre quando uma molécula (poli)aromática planar se interpõe entre os pares de bases consecutivos do DNA, ligando-se perpendicularmente ao eixo da hélice (Figura 4). As forças intermoleculares que mantém a estabilidade do complexo DNA-agente intercalador, leva esta entidade a possuir maior estabilidade que o DNA sozinho. Estas forças são associadas à formação de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, interações de empilhamento π (interação π *stack*) entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas (MARTÍNEZ; CHACÓN-GARCÍA, 2005).

A intercalação de um ligante entre os pares de bases do DNA resulta em uma modificação substancial na estrutura do ácido nucleico, provocando alongamento, enrijecimento e desenovelamento parcial da dupla hélice do DNA. Consequentemente, o esqueleto do DNA perde sua estrutura helicoidal regular, e os ângulos de torção envolvendo os grupos açúcar-fosfato são alterados para acomodar o ligante aromático, causando a separação dos pares de bases no sítio de intercalação (WHEAT, et al., 2007).

Dessa forma, as alterações estruturais promovidas pela interação das bases do DNA e o intercalante desempenham um papel importante, prevenindo a replicação do DNA, e consequentemente inibindo o rápido crescimento de células cancerosas, quando utilizado no tratamento terapêutico. Na Figura 5 são exemplificados alguns núcleos de intercaladores clássicos (WHEATE, et al., 2007).

Figura 5- Estruturas de núcleos clássicos que interagem via intercalação.

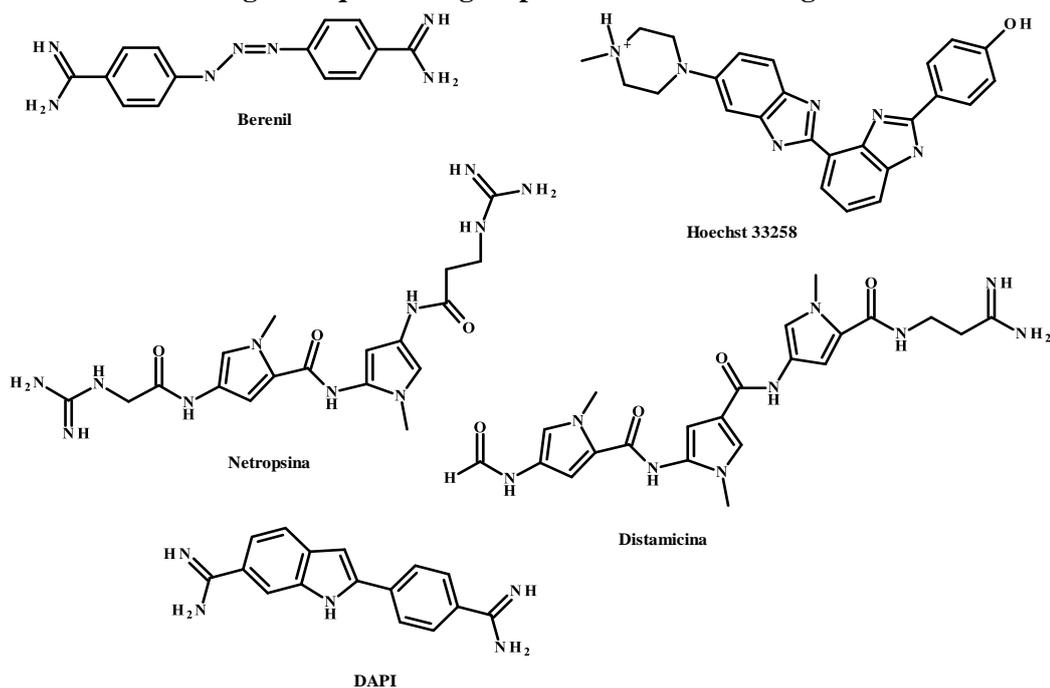


Fonte: adaptado de WHEATE, 2007.

b) Interação nos sulcos (*groove*): envolve a interação direta do ligante com as bases nitrogenadas, tanto pelo sulco maior quanto pelo sulco menor (Figura 4). O *sulco menor* resulta da depressão entre as duas cadeias complementares, e por possuir um sítio de ligação menor (0,6 nm), está susceptível ao ataque de pequenas moléculas. Enquanto que o *sulco maior* resulta da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice, e devido ao seu tamanho (1,2 nm) oferece fácil acesso a ligantes volumosos (Figura 4) (POLICARPI, 2008; KHAN, et al., 2012).

Os sulcos (*groove*) são importantes porque deixam livres superfícies para a interação entre o DNA e as proteínas (MURRAY, et al., 2003). Estes sulcos diferem significativamente no potencial eletrostático e nas características da composição das bases. Nesse tipo de ligação, algumas moléculas interagem com o sulco menor do DNA por ligação de Van der Waals e de hidrogênio. Normalmente, as ligações no sulco menor, têm vários anéis aromáticos (não condensados), tais como pirrol, furano ou benzeno, unidos por ligações que possuem capacidade de torção, facilitando a promoção de interações de Van der Waals. Além disso, esses compostos podem formar ligações de hidrogênio preferencialmente com as bases adenina e timina (HAQ, 2002; ZHANG, HUANG, 2007). Alguns ligantes clássicos que apresentam interação *via groove* são berenil, Hoechst 33258, netropsina, distamicina e DAPI cujas estruturas estão apresentadas abaixo (SALVIA, 2013).

Figura 6- Estruturas de ligantes que interagem preferencialmente via groove.



Fonte: adaptado de SALVIA, 2013.

c) **Ligação externa (eletrostática):** ocorre entre as espécies catiônicas e os grupos fosfatos carregados negativamente presentes no DNA (para uma condição de pH fisiológico). Este mecanismo de interação ocorre ao longo do exterior da hélice (Figura 4). Assim, pode-se observar que tanto a intercalação quanto a ligação nos sulcos (*groove*) estão relacionados com a parte mais interna da dupla hélice do DNA, enquanto a ligação eletrostática está associada com interação fora do sulco ou na superfície da molécula de DNA (parte externa) (REHMAN, 2015b).

1.3 Importância de estudos de interação DNA-ligante

O ácido desoxirribonucleico (DNA) desempenha um papel importante nos processos biológicos, pois é responsável pelo transporte do código genético, onde estão contidas todas as informações necessárias para a síntese das proteínas e enzimas, por meio dos processos de tradução e transcrição (KOOLMAN, ROEHM, 2005).

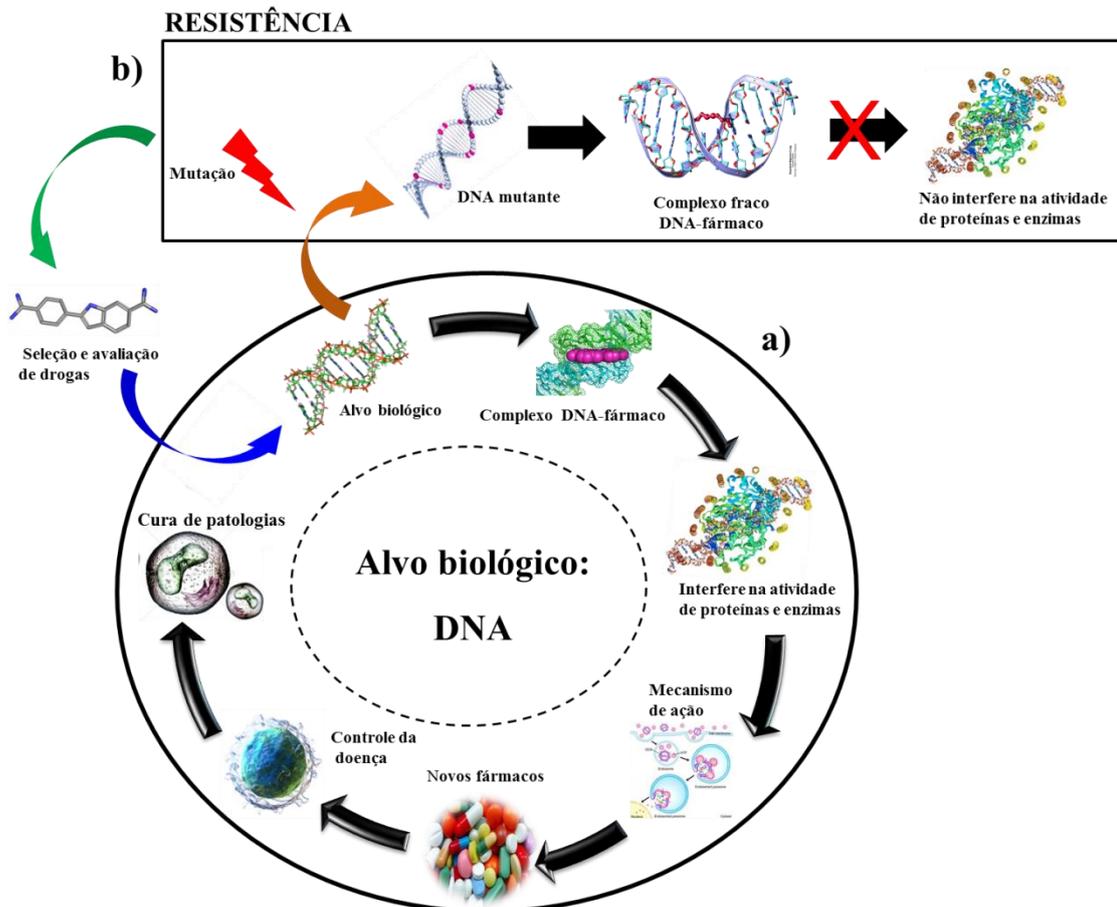
Estudos sobre o mecanismo de ligação de pequenas moléculas com o DNA foram identificados como um dos principais temas durante os últimos anos (GUO, et al., 2011; SHAHABADI; MOGHADAM, 2012; DORRAJI; JALALI, 2013; ZHAO, et al., 2014; HASSAN; RAUF, 2015). Dentro deste contexto geral, as interações DNA-ligante visando à obtenção de fármacos são de particular importância, pois o DNA constitui o alvo intracelular para uma vasta gama de medicamentos, visto que, moléculas pequenas podem interagir com

proteínas associada ao DNA, híbridos de DNA-RNA e diretamente com a dupla hélice do ácido nucleico (RAUF, et al., 2005).

Assim, como mostra a Figura 7a estudos envolvendo a seleção e avaliação de drogas que tem o DNA como alvo biológico são de suma importância. O ligante modelo ao interagir com a biomolécula forma um complexo supramolecular, o qual pode interferir na atividade de várias enzimas e proteínas fundamentais na manutenção da estrutura e função celular. Por consequência, conhecimentos nessa área fornecem informações estratégicas para a compreensão do mecanismo de ação de novos fármacos em nível molecular, podendo levar ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o controle e até mesmo, a cura de diversas patologias (REHMAN, et al., 2015b).

Segundo Shahabadi e Hadidi (2012) as mutações genéticas dão origem a diferentes doenças, assim como podem alterar a eficácia de medicamentos que tem o DNA como alvo. Nesse contexto, a descoberta dos mecanismos celulares para reparação de erros provenientes da divisão celular, da exposição a moléculas reativas e à radiação (como a radiação UV) concedeu o Prêmio Nobel da Química de 2015 ao sueco Tomas Lindahl, ao americano Paul Modrich e ao turco Aziz Sancar por terem mapeado e explicado como a célula repara o DNA que a contém e preserva sua informação genética. Assim, quando esses mecanismos de reparo falham, a informação genética muda rapidamente e o risco de desenvolver doenças (câncer, por exemplo) aumenta. Essa instabilidade genética faz com que o DNA das células neoplásicas seja suscetível a mutações, que as tornam mais resistentes aos tratamentos. Por outro lado, essas células ainda dependem dos mecanismos de reparação parcial, do contrário seu DNA seria muito danificado e a célula morreria. Dentro desta lógica, justifica-se a pesquisa por novos fármacos contra o câncer (Nobel Prize, 2015).

Figura 7- a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias; b) Mecanismo de resistência do DNA a fármacos em função de processos de mutação.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Dessa forma, também é necessário que seja compreendido o mecanismo de resistência desses fármacos utilizados no controle de diversas neoplasias, uma vez que, constitui um problema responsável pelo insucesso do tratamento (por exemplo, na quimioterapia). O processo de resistência pode ocorrer antes do tratamento com o fármaco (resistência primária) ou pode se desenvolver ao longo do tempo após a exposição (resistência adquirida). Neste último caso, por exemplo, pode ocorrer resistência a múltiplas drogas, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto o que foi utilizado inicialmente, quanto aos outros empregados como alternativa, sem semelhança estrutural ou farmacológica ao inicial (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). A resistência a múltiplas drogas pode estar relacionada a uma série de fatores, ainda não compreendidos, como aspectos relacionados à farmacocinética e metabolismo, modificações nas biomoléculas-alvo (mutação do DNA), aumento na reparação do DNA e incapacidade de sofrer apoptose. Assim, algumas células que possuem resistência levam à redução da afinidade do fármaco pelo alvo biológico, formando um complexo supramolecular fraco (Figura 7b), isso contribui para que não haja alterações

nos perfis de atividades das proteínas e enzimas, e, por conseguinte, não levando à cura das doenças (PAXTON, 2012).

Portanto, a concepção de novos e promissores medicamentos para uso clínico é constante no meio científico, visto que existe necessidade da introdução de novos fármacos e tratamento em comparação aos que já existem, seja pela falta de eficiência ou alto nível de toxicidade dos mesmos.

1.4 Técnicas empregadas para o estudo da interação DNA-ligante *in vitro*

Para o estudo do mecanismo de interação entre os ligantes e o DNA, podem ser usadas técnicas instrumentais, como: UV-visível, fluorescência molecular, eletroquímica, ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia de força atômica (MFA), calorimetria, infravermelho (IV), medidas de viscosidade, dicroísmo circular, espectrometria de massas, eletroforese (capilar e em gel), espectroscopia Raman e difração de raios-X. Adicionalmente, podem ser obtidas informações através de estudos teóricos como *docking* e dinâmica molecular. Essas técnicas e estratégias têm sido utilizadas como importantes ferramentas para caracterizar a natureza do complexo supramolecular formado DNA-ligante e os efeitos da interação sobre a estrutura do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Nesse sentido, a Tabela 1 apresenta algumas informações que podem ser obtidas através dessas técnicas e estratégias.

Tabela 1- Informações, parâmetros e comentários gerais sobre as principais técnicas para avaliação da formação do complexo DNA-ligante.

Continua

Técnica / Estratégia	Informações		Parâmetros	Comentários gerais	Referências
	Quali.	Quanti.			
UV-Vis	X	X	Avaliação sobre formação de complexo Constante de ligação Parâmetros termodinâmicos Mecanismo de <i>quenching</i>	Simplicidade, baixa sensibilidade e seletividade. Para avaliação do modo de ligação é necessário desnaturar a dupla fita de DNA (desnaturação térmica), logo não fornece informações sobre o modo de ligação de forma direta.	Komorowska; Olsztyńska-Janus, 2011; Jaumot; Gargallo, 2012; Jangir, et al., 2012; Rehman, et al., 2015b; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Barra; Netto, 2015.
Fluorescência molecular	X	X	Mecanismo de <i>quenching</i> (se houver) Constante de ligação Número de sítios de ligação Parâmetros termodinâmicos e cinéticos Distâncias intermoleculares Modo de ligação	Elevada sensibilidade. Grande faixa de concentração linear. Seletividade. Ligante pode ou não apresentar fluorescência (caso não seja fluorescente, deve-se utilizar sondas).	Yakimchuk, 2011; Komorowska; Olsztyńska-Janus, 2011; Jaumot; Gargallo, 2012; Rehman, et al., 2015b; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Barra; Netto, 2015.
Métodos eletroquímicos	X	X	Constante de ligação Modo de ligação Parâmetros cinéticos Avaliação de processos redox Reversibilidade ou não do processo	O ligante não necessita ser eletroativo, podendo trabalhar com sensor de DNA (pH ~ 4,5), não mimetizando as condições fisiológicas. Apesar do procedimento ser rápido, ao se utilizar biosensor, é necessário produzi-lo para cada ligante diferente. Possibilita indicar quais as bases que interagem, preferencialmente com os ligantes avaliados, bem como avaliar espécies em seus diferentes estados de oxidação.	Komorowska; Olsztyńska-Janus, 2011; Rehman, et al., 2015b; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013.
Ressonância magnética nuclear	X	X	Epítipo do ligante Constante de ligação Modo de ligação Parâmetros termodinâmicos	Determina o epítipo do ligante no processo de interação. As informações podem ser obtidas em diferentes temperaturas, solventes, valores de pH e força iônica. Alto custo. Necessita de concentrações altas e solventes deuterados. Os ligantes avaliados devem apresentar boa solubilidade em água.	Yakimchuk, 2011; Jaumot; Gargallo, 2012; Rehman, et al., 2015b; Wanunu; Tor, 2012.
Microscopia de força atômica	X		Mudanças na morfologia do DNA durante o processo de interação	Necessita de altas concentrações tanto do DNA quanto do ligante. Utiliza-se plasmídeo, pois não permite a avaliação com DNA que possua uma menor quantidade de bases.	Garcia, et al., 2010; Rehman, et al., 2015b;
Estudos calorimétricos	X	X	Parâmetros termodinâmicos Constante de ligação; Número de sítios e modo de ligação	Baixa taxa de transferência e sensibilidade. Necessita de grandes volumes de amostra e DNA. A solubilidade dos ligantes em água é uma limitação.	Rehman, et al., 2015b; Wanunu; Tor, 2012.

Tabela 1- Informações, parâmetros e comentários gerais sobre as principais técnicas para avaliação da formação do complexo DNA-ligante.

Conclusão

Infravermelho	X			Conformação do DNA	Amostras podem ser analisadas em diferentes estados de agregação, como sólidos ou em solução. Pequenas quantidades de amostra. Rápido e de fácil execução.	Rehman, et al., 2015b; Barra; Netto, 2015
Medidas de viscosidade	X			Modo de ligação	Baixo custo. Necessita de baixas concentrações, gera apenas informações qualitativas.	Rehman, et al., 2015b; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Wanunu; Tor, 2012.
Dicroísmo circular	X			Distorções na estrutura do DNA Conformação do DNA Modo de ligação	Alta sensibilidade. Elevado tempo de aquisição dos espectros.	Jaumot; Gargallo, 2012; Jangir, et al., 2012; Rehman, et al., 2015b; Wanunu; Tor, 2012..
Espectrometria de massas	X	X		Estequiometria do complexo Constante de ligação Modo de ligação	Rápido e com alta sensibilidade. Permite determinar seletividade o ligante frente a vários alvos. Pequenas quantidades de amostra. Pode-se utilizar diferentes ligantes simultaneamente. Técnica destrutiva. Comumente apresenta como limitação o uso de fragmentos de DNA com poucas bases.	Jaumot; Gargallo, 2012; Rosu; Pauw; Gabelica, 2008; Wanunu; Tor, 2012.
Eletroforese	Capilar	X	X	Modo de ligação e constante de ligação	Simplicidade, contudo, baixa reprodutibilidade e sensibilidade. Em alguns casos, o uso da eletroforese capilar é restrito ao emprego de fragmentos de DNA.	Jaumot; Gargallo, 2012; Araya, et al., 2007
	Gel	X		Modo de ligação		
Espectroscopia Raman	X			Modo de ligação Determina quais as bases que interagem preferencialmente com os ligantes.	Rápido e apresenta alta sensibilidade. Necessita de pequenas quantidades de amostra. Espectros são registrados utilizando água como solvente.	Jangir, et al., 2012;
Difração de raios-X	X			Modo de ligação Estrutura tridimensional do complexo Localização e orientação do DNA Conformação do DNA	Soluções e comportamento de moléculas em solução não podem ser examinados. Limitada a obtenção de cristais em condições de difratar a luz.	Yakimchuk, 2011; Garcia, et al., 2010; Wanunu; Tor, 2012.
<i>Docking</i> molecular	X	X		Energia de ligação Alteração na conformação do ligante Estrutura espacial do complexo Modo de ligação	Considera estrutura rígida. Considera o vácuo como meio. Não considera efeito do solvente e grau de protonação das moléculas.	Rehman, et al., 2015b.

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível, fluorescência molecular e *docking*, para avaliação da interação de compostos bioativos e o ctDNA (*Calf Thymus*). Essa avaliação possibilitou o cálculo dos valores das constantes de interação, número de sítios de ligação (estequiometria), parâmetros termodinâmicos, além de caracterizar o modo de ligação dos compostos avaliados com o DNA. Assim, algumas técnicas mais comumente empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante são descritas abaixo, considerando os principais aspectos das informações que podem ser obtidas quanto a interação entre o DNA e os ligantes *in vitro*.

1.4.1 Espectroscopia no UV-visível

A espectroscopia de absorção no UV-visível é uma das técnicas mais simples e amplamente utilizada na avaliação tanto da estabilidade do DNA quanto sua interação com ligantes (REHMAN, et al., 2015a). No entanto, essa técnica não fornece informações precisas quando ligante e macromolécula absorvem radiação na mesma região. Como as medidas são baseadas na atenuação da radiação eletromagnética pela espécie absorvente, caso ligante, DNA e complexo formado apresentem comprimentos de onda de máxima absorção próximos, uma espécie pode influenciar na obtenção do sinal analítico da outra, causando interferência espectral e imprecisão nas medidas realizadas. Neste sentido, a aplicação da técnica no UV-Vis para avaliação da interação de ligantes com DNA mostra variações mais acentuadas quando o ligante absorve preferencialmente no visível.

O espectro de absorção do DNA mostra uma banda característica na região do UV com comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) em 260 nm, relativo aos grupos cromóforos das purinas (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e guanina), os quais são responsáveis pelas transições eletrônicas. Esta técnica permite a determinação da concentração molar do DNA utilizando a lei de Beer, por meio da medição do valor de absorvância em 260 nm. Para avaliar a pureza do DNA, emprega-se a razão das absorvâncias A_{260}/A_{280} ou A_{260}/A_{230} , onde a proporção deve estar no intervalo 1,8-2,0 para assegurar DNA suficientemente livre de proteínas ou compostos usados no processo de purificação ou conservação, como fenol, por exemplo (SAVARIZ, et al., 2014).

O estudo da interação pode ser realizado empregando espectroscopia no UV-vis em função das alterações nas propriedades de absorção do ligante ou do DNA. Um modo simples de avaliar se existe qualquer interação entre o DNA e o ligante se dá pelo monitoramento da absorvância da solução contendo DNA livre e na presença do ligante (ligado). Quando se observa deslocamento no valor do $\lambda_{\text{máx}}$ comparando-se o DNA na ausência e presença do ligante é indicativo que houve interação, contudo, aspectos relacionados à concentração de

cada espécie, assim como a magnitude do deslocamento devem ser considerados (JAMOUT; GARGALLO, 2012; WEI; WANG; ZHANG, 2010; SUN, et al, 2011).

Nesse contexto, pode-se também inferir se ocorreu a formação de complexo supramolecular entre a biomolécula e o ligante, com base nos deslocamentos dos máximos de absorção. Desta forma, é avaliado se o somatório das absorvâncias das soluções dos ligantes de interesse (A_{composto}) e da solução de DNA (A_{DNA}) são diferentes do valor de absorvância da solução contendo as duas espécies ($A_{\text{composto-DNA}}$), ou seja: $A_{\text{composto}} + A_{\text{DNA}} \neq A_{\text{composto-DNA}}$. Quando isto se confirma é indicativo da formação de complexo ligante-DNA em virtude da não observância do efeito aditivo da lei de Beer, implicando que o complexo formado apresenta coeficiente de absorvância molar (maior ou menor) que os compostos isolados (Wu, et al., 2011).

Uma vez que o DNA apresente interação com o ligante, pode-se fixar uma das espécies e variar a concentração da outra no meio, realizando-se uma titulação espectrofotométrica. Com base na variação da absorvância, a constante de ligação com o DNA pode ser determinada a partir da equação abaixo (SHAHABADI; HADIDI, 2012):

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K_b(A_\infty - A_0)} \times \frac{1}{[L]} \quad \text{Equação (1)}$$

onde A_0 é a absorvância do DNA a 260 nm na ausência do ligante, A_∞ é a absorvância final DNA-ligante, A é a absorvância registrada em diferentes concentrações do DNA adicionado, $[L]$ corresponde a concentração do ligante e K_b é a constante de ligação, que pode ser obtida por meio do inverso do coeficiente angular do gráfico $1/(A - A_0)$ versus $1/[DNA]$.

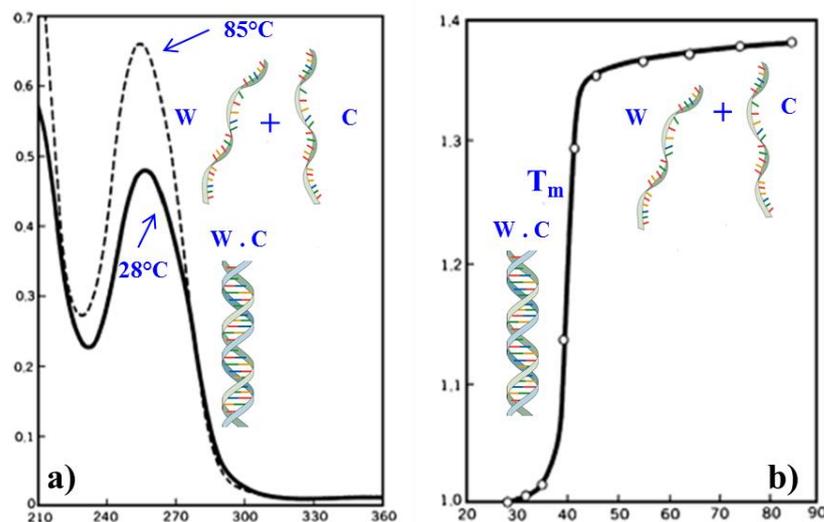
Assim, de forma geral, quando um ligante interage com o DNA e forma um complexo, as mudanças nos valores de absorvância e na posição da banda devem ocorrer. Se o modo de ligação for intercalação, o orbital π^* do ligante intercalado pode acoplar com o orbital π dos pares de bases de DNA, e assim diminuir a energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, resultando em efeito batocrômico (deslocamento para maiores comprimentos de onda em relação ao $\lambda_{\text{máx}}$). Por outro lado, a intercalação envolve forte interação entre o cromóforo aromático e os pares de bases do DNA, uma diminuição do coeficiente de absorvância molar (ϵ) irá acarretar em efeito hipocrômico (MOHAMADI, et al., 2015).

Segundo Shahabadi e colaboradores (2012) alterações na estrutura da dupla hélice do DNA levam a diferentes mudanças espectrais. Assim, de forma geral, a estabilização da estrutura secundária do DNA, por meio de ligação eletrostática ou intercalação conduz a um efeito hipocrômico (diminuição da absorvância molar), enquanto a desestabilização por meio da desnaturação térmica, por exemplo, resulta em efeito hiperocrômico (aumento da absorvância molar).

1.4.1.1 Estudos de desnaturação térmica

A estabilidade do DNA ao interagir com moléculas pequenas é facilmente estudada utilizando a medição da absorção UV-visível em função da variação da temperatura. As duas fitas de DNA são mantidas juntas, principalmente, pelas interações de empilhamento e ligações de hidrogênio conferindo estabilidade a dupla hélice, como já mencionado. Porém, quando a dupla hélice do DNA é exposta a agentes desnaturantes, ocorre um enfraquecimento das várias forças de ligação, e a dupla hélice separa-se em duas fitas simples que se encontram em conformação espiral aleatória. Nesse caso, a interação entre as bases será reduzida, aumentando a absorção da radiação eletromagnética da solução de DNA (Figura 8a), visto que as bases encontram-se na forma livre e não formam ligações de hidrogênio com as bases complementares. Como resultado, a absorvância para o DNA de cadeia simples é cerca de 40% maior do que para o DNA de cadeia dupla à mesma concentração. Além disso, o efeito hipercrômico surge principalmente devido a presença de cátions que se ligam ao DNA por meio de atração eletrostática com os grupos fosfato, causando danos gerais para a estrutura secundária da biomolécula (ARJMAND, JAMSHEERA, 2011).

Figura 8- Perfil espectral do DNA em função da temperatura. a) Espectro de absorção do DNA a 28°C (DNA /Watson-Crick) e 85 °C (separação das fitas); b) Curva de desnaturação do DNA.



Fonte: adaptado de NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008.

Estudos de desnaturação térmica são geralmente realizados para elucidar o modo de ligação de moléculas pequenas com o DNA. Com aumento da temperatura do meio, a dupla hélice do DNA é desnaturada com geração de cadeias simples. Este fato leva a alteração da absorvância da solução ($\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$). A temperatura na qual 50% do DNA se encontra como fita dupla e 50% na forma de fita simples é denominada como temperatura de desnaturação (T_m) e está fortemente relacionada com a estabilidade da estrutura dupla hélice

(Figura 8b). O valor de T_m varia conforme alguns fatores como percentual de bases CG, pH, força iônica, concentração de solventes orgânicos, tipo de tampão, entre outros (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008). Para avaliar o modo de ligação de pequenas moléculas com o DNA, calcula-se o T_m na ausência e na presença do ligante, empregando a seguinte equação:

$$f_{ss} = \frac{A - A_0}{A_f - A_0} \quad \text{Equação (2)}$$

onde f_{ss} corresponde a fração de DNA como fita simples, A_f e A_0 representam os valores de absorvância máximo (DNA em fita simples) e mínimo (DNA em fita dupla) a 260 nm, respectivamente (SHEN, et al., 2011). A temperatura de desnaturação do DNA (T_m) foi definida quando f_{ss} corresponde a 0,5. Dessa forma, o valor de T_m pode ser obtido representando graficamente f_{ss} versus a temperatura.

Quando o modo de interação com DNA é intercalação, ocorre um aumento na temperatura de desnaturação do DNA acima de 5°C ($\Delta T_m > 5$) (SUN, et al., 2014). Esta variação positiva no valor de T_m é atribuído ao aumento da estabilidade da dupla hélice do DNA devido a intercalação do ligante no interior da cadeia. No entanto, quando a molécula não interage por intercalação não é observado aumento no valor de T_m (SARWAR, et al., 2015).

1.4.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais comumente utilizadas nos estudos de interação entre ligantes e o DNA. As vantagens da fluorescência molecular comparada às demais técnicas espectroscópicas, são a sua alta sensibilidade, a grande faixa de concentração linear, seletividade, além de suas medidas serem relacionadas ao ligante livre, tratando-se de uma medida direta da espécie livre ou complexada, sem interferência espectral. Em geral, os ligantes que contêm grupos funcionais (poli)aromáticos possuem intensa fluorescência, em comparação com pequenas moléculas que possuam em sua estrutura radicais derivados de hidrocarbonetos alifáticos, carbonilas ou compostos altamente conjugados não aromáticos. Uma vez que o DNA não apresenta fluorescência, as mudanças no sinal de fluorescência são relacionadas ao ligante livre ou do complexo formado com o ácido nucléico (REHMAN, et al., 2015b).

Assim, os estudos relacionados à variação da intensidade do sinal em função de titulações fluorimétricas podem fornecer informações, como: o mecanismo de *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), número de sítios de ligação (estequiometria), constantes de

ligação (K_b), parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), tipos de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação e o modo de ligação preferencial (ZHAO, et al., 2014). Ressalta-se que o mecanismo de *quenching* só é considerado quando ocorre redução da fluorescência, em muitos casos, a adição de DNA pode levar ao aumento do sinal.

1.4.2.1 Mecanismo de *quenching*

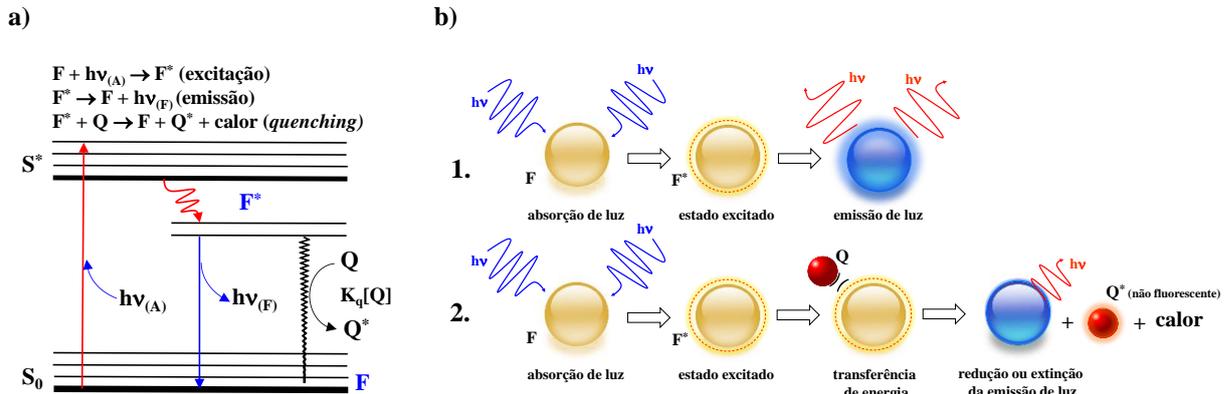
O processo de *quenching* associado à fluorescência fornece evidências de interações moleculares. Segundo Wang e colaboradores (2015), *quenching* refere-se a qualquer processo em que ocorre a diminuição na intensidade de fluorescência de uma espécie, podendo ocorrer por vários mecanismos, como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisão. A espécie que fornece um caminho não radioativo para desativação do fluoróforo é denominada *quencher*, isto é, ao entrar em contato com o fluoróforo no estado excitado essa espécie o desativa inibindo a emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Nesse trabalho, a molécula que funciona como *quencher* (quando houver) é o DNA, visto que este não fluoresce, e em solução com os ligantes avaliados leva a diminuição do sinal analítico.

Existem vários mecanismos relacionados ao processo de *quenching*, os principais, são: *quenching* dinâmico (colisional) ou estático, porém em alguns casos, ambos os mecanismos podem ocorrer. Esquemáticamente, esses mecanismos podem ser representados como transferência de energia a partir de uma espécie excitada (F^*) e uma espécie *quencher* (Q), que podem levar a desativação do fluoróforo (F) no estado fundamental ou excitado (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

Dessa forma, *quenching* dinâmico refere-se a um processo em que o fluoróforo no estado excitado entra em contato com a espécie *quencher* durante a existência do estado excitado, ocorrendo choque entre ambos, resultando na desativação radioativa do fluoróforo. Após a colisão, ocorre transferência de energia do fluoróforo no estado excitado para a espécie *quencher*, levando assim a uma diminuição do sinal de fluorescência (Figura 9a e 9b).

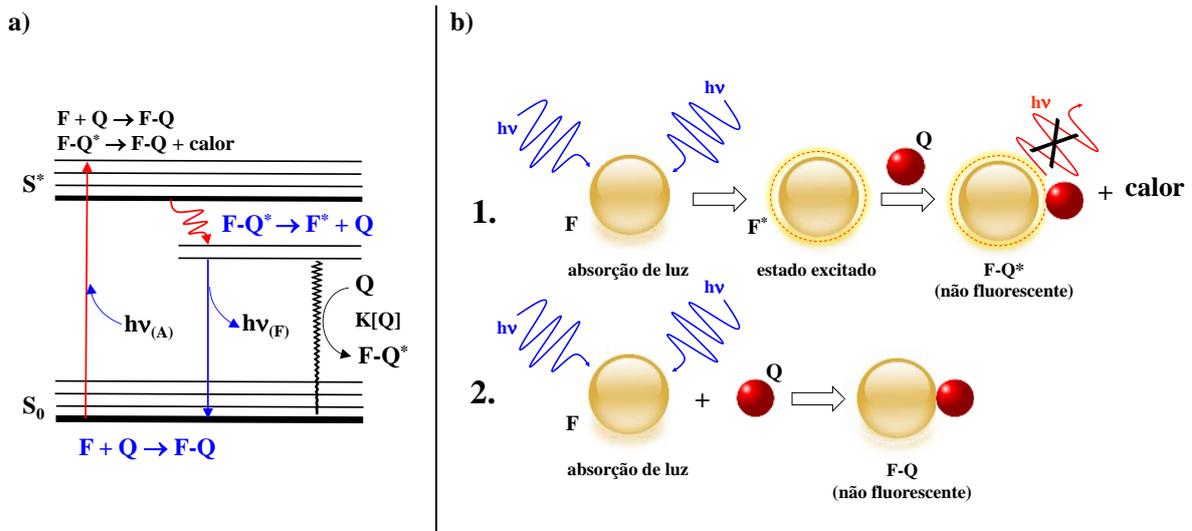
Enquanto no *quenching* estático, o fluoróforo no estado excitado entra em contato com o *quencher*, levando à formação de um complexo não-fluorescente (F-Q) no estado fundamental, resultando na desativação radioativa do fluoróforo, liberação de calor e conseqüentemente redução no sinal analítico (Figura 10a e 10b) (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

Figura 9- Representação do processo de *quenching* dinâmico ou colisional. a) Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de *quenching* dinâmico. b) Representação genérica de um sistema na ausência (1) e presença de um *quencher* Q (2).



Fonte: DANTAS, 2015.

Figura 10- Representação do processo de *quenching* estático. a) Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de *quenching* estático. b) Representação genérica de um sistema na presença de um *quencher* Q.



Fonte: DANTAS, 2015.

O efeito quantitativo da presença de agentes desativadores na fluorescência (*quenching*) medida pode ser observado pela equação de Stern-Volmer (Equação 3), a qual indica a sensibilidade dos ligantes frente a sua interação com o DNA, em função do sinal analítico diminuir na presença de um agente supressor (ALBANI, 2007).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \text{ ou } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{Equação (3)}$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente; K_q é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), τ_0 é o tempo de vida médio (10^{-8} s), $[Q]$ é a concentração do ligante que

atua como *quencher* (DNA) e K_{SV} é a constante de *quenching*, que pode ser obtida por meio do coeficiente angular do gráfico F_0/F versus $[Q]$.

De acordo com Rehman e colaboradores (2015b), a avaliação do tipo de *quenching* pode ser realizada a partir do estudo por UV-Vis ou por meio de experimentos em diferentes temperaturas, calculando-se os valores das constantes (K_{SV}). Por UV-Vis avalia-se os espectros de absorção do DNA, do ligante livre e do complexo formado, onde se verifica as mudanças que ocorrem na presença e ausência do DNA. Caso o mecanismo de *quenching* seja dinâmico não são esperadas mudanças no espectro molecular de absorção no UV-Vis do complexo ($A_{\text{complexo}} = A_{\text{composto}} + A_{\text{DNA}}$), visto que o *quenching* dinâmico afeta somente o estado excitado, e não o estado fundamental. No entanto, caso o *quenching* seja estático, haverá mudanças nos perfis e na intensidade dos respectivos espectros (WU, et al., 2011).

Por meio de experimentos de fluorescência molecular (titulação), são avaliados os valores de K_{SV} , quando este valor aumenta em função do aumento da temperatura é indicativo de *quenching* dinâmico, visto que em temperaturas mais altas há um maior coeficiente de difusão, e por consequência, um maior número de choques entre o ligante fluorescente e o *quencher* (DNA). Quando os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, uma vez que desestabiliza o complexo DNA-ligante (ZHANG, et al., 2009).

1.4.2.2 Constantes de ligação (K_b)

Além da constante de Stern-Volmer também é possível calcular o valor da constante de ligação (K_b) e determinar o número de sítios de ligação, isto é, a estequiometria do complexo supramolecular formado. Nesse sentido, existem algumas equações que relacionam a variação da intensidade da fluorescência do complexo com o aumento da concentração do DNA. A Tabela 2 apresenta uma compilação das principais equações utilizadas na literatura com suas respectivas características.

Tabela 2- Principais equações para calcular a constante de ligação (K_b).

Descrição matemática	Características	Equação	Referências
$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [\text{DNA}]$	i. Usada na forma logarítmica; ii. Emprega a concentração total do ligante quando deveria usar a concentração na forma livre.	(4)	Mohamadi, et al., 2015
$\frac{r}{C_f} = K_b(1 - nr)$	i. Usada na forma linear; ii. Emprega a concentração livre do ligante; iii. Necessário a saturação do sistema, para se calcular a concentração do complexo.	(5)	Dar, et al., 2015
$\frac{r}{C_f} = K_b(1 - nr) \left\{ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right\}^{(n-1)}$	i. Usada na forma não-linear; ii. Emprega a concentração livre do ligante; iii. Necessária a saturação do sistema, para se calcular a concentração do complexo.	(6)	Islam, et al., 2015
$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b + n \log \left(\frac{1}{[\text{DNA}]_T - \frac{F_0 - F \cdot [L]_T}{F_0}} \right)$	i. Usada na forma logarítmica; ii. Emprega a concentração total do ligante e da macromolécula; iii. Apresenta resultados similares a equação (3).	(7)	Sun, et al., 2014
$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_b F_0 [\text{DNA}]}$	i. Usada na forma linear; ii. Emprega a concentração total da macromolécula; iii. Não fornece o número de sítios de ligação (n).	(8)	Choi, et al., 2006
$\frac{1}{\Delta F_f} = \frac{1}{K_b(F - F_0)[\text{DNA}]} + \frac{1}{(F - F_0)}$	i. Usada na forma linear; ii. Não fornece o número de sítios de ligação (n).	(9)	Ilanchelian; Ramaraj, 2004

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nas equações listadas da Tabela 2, K_b é a constante de ligação, n o número de sítios de ligação, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente. $[L]$ é a concentração do ligante, C_f é a concentração livre do ligante e r corresponde a razão molar do ligante em relação ao DNA. As características dessas equações devem ser levadas em consideração na sua escolha para calcular a constante de ligação nos estudos de interação macromolécula-ligante.

1.4.2.3 Modo de ligação

A espectroscopia de fluorescência molecular é frequentemente usada para determinar o modo de ligação do ligante ao interagir com DNA por meio de alguns ensaios que se baseiam nas propriedades de emissão do ligante na ausência e na presença do DNA. Assim, o modo de ligação foi proposto de acordo com duas estratégias: avaliação do efeito de *quenching* do KI e competição com sondas (REHMAN, et al., 2015a; SARWAR, et al., 2015).

1.4.2.3.1 Ensaio com iodeto de potássio (KI)

O íon iodeto é capaz de promover o *quenching* dinâmico de moléculas fluorescentes em solução. Contudo, o ligante deve estar acessível para que ocorra a interação com o íon iodeto. Desta forma, emprega-se como critério a comparação do valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}), que indica a acessibilidade do íon iodeto ao fluoróforo, na ausência e presença de DNA. A intercalação de ligantes na dupla hélice do DNA impede que o inibidor aniônico tenha acesso ao fluoróforo, levando a uma diminuição do valor de K_{SV} na presença do DNA. No entanto, quando o modo de ligação se dá, preferencialmente, *via groove* ou eletrostático, os ligantes estão mais acessíveis ao íon iodeto circundante, assim a probabilidade de colisão entre a molécula pequena e o ânion iodeto é facilitada tanto na ausência quanto na presença de DNA. Dessa forma, os valores de K_{SV} na presença de DNA tendem a ser maiores, uma vez que existe uma quantidade maior do ligante livre em solução (LING et al., 2008; REHMAN, et al., 2015b).

1.4.2.3.2 Ensaios de competição

Os ensaios de competição são comumente utilizados para inferir sobre o modo de ligação DNA-ligante. Nesses experimentos são empregados ligantes que possuem seu modo de ligação bem estabelecido, como brometo de etídio e acridina orange (sondas para intercalação) e Hoechst 33258 e DAPI (sondas para *groove*).

O brometo de etídio (EB) é amplamente utilizado como sonda de fluorescência que se liga ao DNA *via* intercalação, apresentando na forma livre baixa emissão de fluorescência, contudo quando o mesmo intercala com DNA, ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência. A presença de um ligante com mesmo modo de ligação com DNA no sistema pode levar ao deslocamento do EB intercalado, e por consequência conduz a uma diminuição na intensidade de fluorescência, pois parte do EB estaria na forma livre (não intercalada) (SAVARIZ, et al., 2014). O grau na redução do sinal de fluorescência pode ser usado para determinar a magnitude da intercalação entre a macromolécula e o ligante. No entanto, os ligantes que se ligam preferencialmente *via* outro mecanismo de ligação (*groove* ou eletrostático), não provocam efeito algum sobre o sinal analítico do complexo formado entre DNA-EB. Acridina orange (AO) também é utilizada nos ensaios de competição, apresentando comportamento similar ao EB (REHMAN, et al., 2015b).

Além disso, esses ensaios podem ser realizados usando sondas que se ligam *via groove* ao DNA, como Hoechst 33258 e DAPI, em que ligantes com esse mesmo modo de ligação são capazes de deslocar a sonda dos sulcos do DNA, levando a redução no sinal de fluorescência (BASU; KUMAR, 2013), de forma similar ao descrito para o EB.

1.4.2.4 Parâmetros termodinâmicos

A espectroscopia de fluorescência, assim como outras técnicas, pode ser utilizada para determinar parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação de ligantes com o DNA. Ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas são as quatro principais interações não covalentes, que desempenham um papel importante na interação DNA-ligante (HAQ, 2002).

A formação de complexos entre ligantes e o DNA é estudada a diferentes temperaturas possibilitando a determinação de vários parâmetros termodinâmicos como variação da entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) por meio da aplicação da equação de Van't Hoff representada abaixo:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (10)}$$

onde K_b representa a constante de ligação, T a temperatura em Kelvin (K) e R a constante do gás ideal ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Enquanto que o valor da energia livre de Gibbs pode ser calculado tanto em função dos valores de ΔH e ΔS (Equação 11), quanto pelo valor da constante de ligação (Equação 12):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (11)}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{Equação (12)}$$

De forma geral, a intercalação de ligantes na dupla hélice do DNA é estabilizada por interações hidrofóbicas e de van der Waals, enquanto que moléculas ligantes nos sulcos do DNA interagem, principalmente por meio de interações hidrofóbicas (REHMAN, et al, 2015b).

Como critério, a interação por forças eletrostáticas é dominante quando $\Delta H < 0$ (ou $\Delta H \approx 0$) e $\Delta S > 0$, enquanto que interações hidrofóbicas são consideradas a principal força quando $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$. Por fim, as ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals são associados com $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$. Além disso, é possível avaliar a espontaneidade do processo de interação por meio do cálculo da energia livre de Gibbs (ZHANG, et al., 2009).

1.5 Patologias tendo como alvo biológico o DNA

A partir das concepções mais recentes sobre a estrutura do DNA, este tem sido um dos principais alvos (Figura 6) para várias moléculas terapeuticamente importantes, que apresentam desde atividade antitumoral até ação como antibióticos. Nesse sentido, a seguir serão apresentadas algumas características de patologias que possuem como um dos principais alvos farmacológicos o DNA, dentre elas, merece destaque o câncer e algumas doenças parasitárias como a malária, a doença de chagas e leishmaniose.

1.5.1 O câncer

O câncer é considerado a segunda maior causa de morte nos países industrializados (sendo a primeira as doenças cardiovasculares) onde uma em cada quatro pessoas adquire a doença e uma em cinco morrerá (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005). A palavra **câncer** é originada do latim *cancer* e significa caranguejo, essa designação se deve à semelhança entre as pernas do crustáceo e a invasão do tumor, que penetram nos tecidos sadios do corpo. A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia (especificamente aos tumores malignos), utilizada para designar um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Além disso, sua origem se dá por condições multifatoriais. Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (ALMEIDA, et al., 2005; INCA, 2014).

As modificações que causam as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Após serem ativados, estes se transformam em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais.

Estas células diferenciadas são, então, denominadas cancerosas ou tumorais. Tais células passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se descontroladamente. Devido a rápida e constante multiplicação celular, se faz necessário que novos vasos sanguíneos sejam formados para nutrição das células, em um processo denominado angiogênese (BELIZÁRIO, 2002). Os tumores malignos são o resultado da manutenção e o acúmulo de massa dessas células, que por sua vez, podem desligar-se do tumor e invadir os tecidos vizinhos. Em sequência, pode chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, por meio destes disseminar até para órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando assim, as metástases (BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ, 2003). As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as correspondentes normais, assim, conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos

invadidos perdem progressivamente suas funções, levando à falência do órgão ou, em casos mais graves, à morte do enfermo (BELIZÁRIO, 2002).

1.5.1.1 Estimativa sobre a incidência de câncer no Brasil

Devido ao grande desenvolvimento do câncer no Brasil (e no mundo), esse tema ganha relevância pelo perfil epidemiológico que a doença vem apresentando, e, com isso, conquista espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo.

Nesse sentido, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) merece destaque devido ao seu papel nacional no desenvolvimento de diversas ações capazes de conscientizar a população sobre a importância da prevenção e possibilitar o controle da doença no país (INCA, 2015).

Há 18 anos, o INCA fornece à sociedade brasileira estimativas de novos casos de câncer, para prover gestores, serviços de saúde, universidades, centros de pesquisa e sociedades científicas com informações atualizadas que possam subsidiar um maior conhecimento sobre a ocorrência da doença na população brasileira e nas suas regiões (INCA, 2015). Atualmente, esta publicação é realizada bianualmente, onde são considerados os principais tipos de câncer em termos de magnitude e impacto. As estimativas de 2014 são válidas também para 2015, as quais apontam a ocorrência de cerca 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (182 mil novos casos), seguido de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (31 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (17 mil). A Tabela 3 mostra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil que foram estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2014).

Tabela 3- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil.

HOMENS				MULHERES		
Localização primária	Casos novos (x1000)	Percentual (%)		Localização primária	Casos novos (x1000)	Percentual (%)
Próstata	68,8	22,8		Mama feminina	57,1	20,8
Traqueia, brônquio e pulmão	16,4	5,4		Colo do útero	17,5	6,4
Cólon e reto	15,1	5,0		Cólon e reto	15,6	5,7
Estômago	12,9	4,3		Glândula tireoide	10,9	4,0
Cavidade oral	11,3	3,7		Traqueia, brônquio e pulmão	8,05	2,9
Esôfago	8,01	2,6		Estômago	7,52	2,7
Bexiga	6,87	2,3		Ovário	5,90	2,2
Laringe	6,75	2,2		Corpo do útero	5,68	2,1
Linfoma não Hodgkin	5,05	1,7		Linfoma não Hodgkin	4,85	1,8
Sistema Nervoso Central	4,96	1,6		Sistema Nervoso Central	4,32	1,6

Fonte: adaptado do INCA, 2014.

Desta forma, diante do perfil epidemiológico que o câncer vem demonstrando, se faz necessário conhecer os tipos de tratamento que podem levar ao controle e até mesmo a cura da doença.

1.5.1.2 Tipos de tratamento do câncer

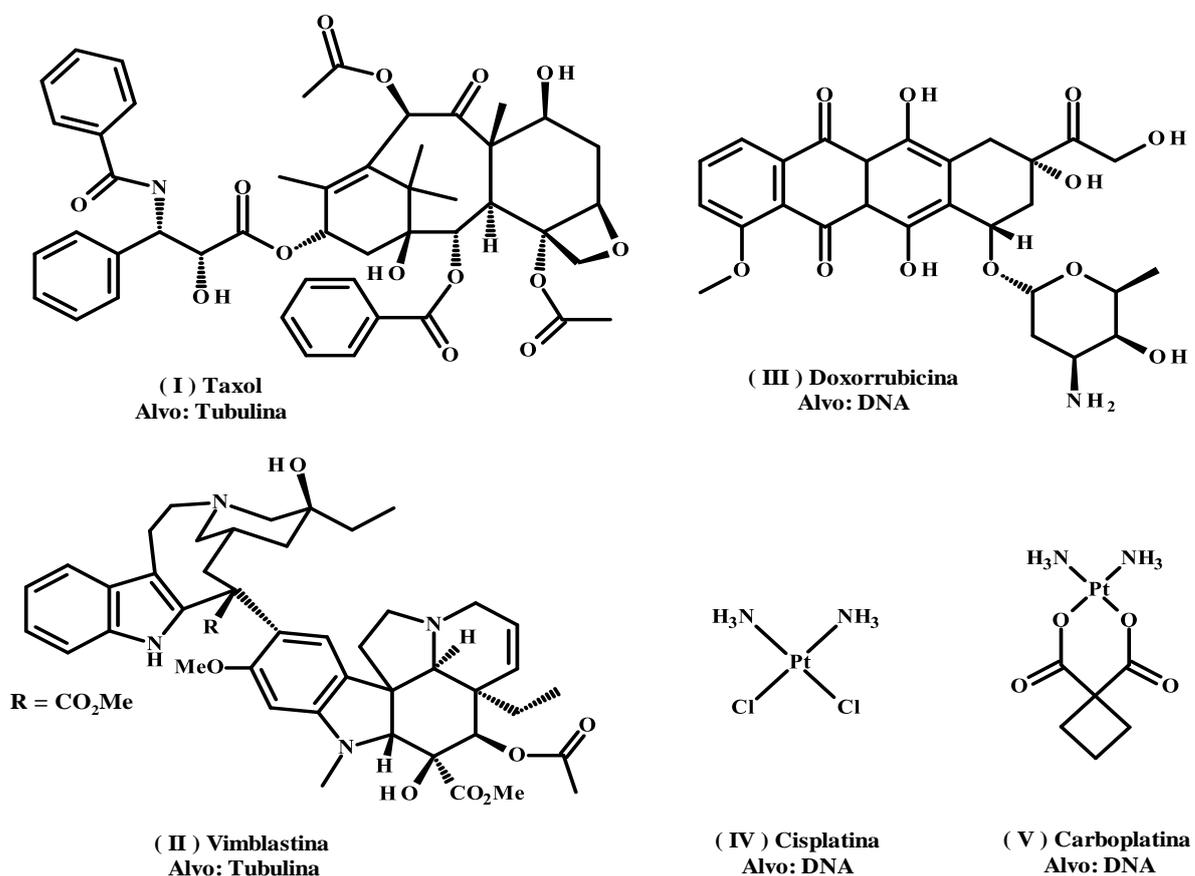
O desenvolvimento da maioria dos cânceres passa por vários estágios, que podem ocorrer ao longo de muitos anos. Assim, alguns tipos de câncer podem ser evitados pela eliminação da exposição aos fatores determinantes. Caso o potencial de malignidade seja detectado antes das células tornarem-se malignas, ou numa fase inicial da doença, existe uma condição mais favorável para o tratamento e, conseqüentemente, há maior possibilidade de cura (INCA, 2015). Assim, os principais tipos de tratamento do câncer utilizados atualmente, são a cirurgia, a radioterapia e quimioterapia, sendo a cirurgia, para alguns tipos de câncer, o tratamento inicial (DUVAL, et al., 2010).

Cirurgia e radioterapia são apropriadas para tratamento da doença localizada e regional, e pode curar nos estágios precoces do câncer. A radioterapia é um tratamento no qual se utilizam radiações ionizantes (raios-x, por exemplo), de alta energia capazes de destruir e/ou impedir que as células tumorais aumentem (VIDAL, 2008). Em geral, a radioterapia (e cirurgia) tem papel limitado no câncer em estágios avançados, além da possibilidade de surgirem efeitos colaterais (TRUFELLI, 2008). Por outro lado, a quimioterapia representa uma das formas de tratamento contra o câncer de maior escolha visando controle, palição e em algumas situações até mesmo a cura (SAWADA, et al., 2009).

O objetivo primário da quimioterapia é eliminar as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não seletiva, lesando tanto células malignas quanto normais. Esse fator é o grande responsável pela maioria dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Entretanto, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na procura de um índice terapêutico favorável (MACHADO, 2000). Um fator importante para o êxito da quimioterapia é que o tumor seja diagnosticado o mais rápido possível com tamanho inferior a 1cm. A quimioterapia envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por *via* endovenosa. No intuito de atingir o maior nível de morte celular possível, utilizam-se doses mais altas, porém o tratamento deve ser repetido em vários ciclos para garantir a morte das células tumorais. O principal foco das pesquisas neste âmbito consiste na melhoria da eficiência da quimioterapia e, quando possível, na combinação de diversos agentes antineoplásicos, onde se tem conseguido resultados surpreendentes com índices de cura de 75 a 90% em diversos tipos de câncer (ALMEIDA, et al., 2005; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Na Figura 11 são apresentados compostos utilizados na quimioterapia e seus principais alvos biológicos, sendo alguns deles compostos orgânicos (taxol, vimblastina e doxorrubicina), como também, complexos metálicos (cisplatina e carboplatina). Dentre os compostos orgânicos destaca-se a doxorrubicina, que é um composto derivado das antraciclinas e tem sido usada como quimioterápico devido a sua ampla atividade antitumoral. De forma geral, as antraciclinas causam danos irreversíveis às células tumorais por se intercalarem no DNA, inibirem a síntese de proteínas e produzirem espécies reativas de oxigênio, causando a morte celular. Com o tempo, no entanto, verificou-se que a doxorrubicina produz efeitos colaterais que se tornam cada vez mais intensos, como por exemplo, a dilatação do coração, levando a insuficiência cardíaca e, em alguns casos à morte (CAMPOS, et al., 2011).

Figura 11- Compostos utilizados no tratamento do câncer: I) taxol; II) vimblastina; III) doxorrubicina, IV) cisplatina, V) carboplatina.



Fonte: adaptado de FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005; ALMEIDA, et al., 2005.

Um dos complexos metálicos mais conhecidos e eficientes como agentes antineoplásicos no tratamento de vários tipos de tumores é a cisplatina, porém a sua utilidade clínica está limitada devido aos fortes efeitos colaterais (PASSOS, 2006). Uma alternativa útil é a utilização da carboplatina, pois sua ligação com as proteínas plasmáticas é menos efetiva

que a da cisplatina, logo sua excreção tende a ser mais rápida, apresenta menor toxicidade gastrointestinal e renal, contudo, apresenta mielossupressão (ALMEIDA, et al., 2005). A cisplatina tem apresentado potencial terapêutico para o tratamento dos tumores do testículo, ovário, melanomas malignos, tumores da cabeça e pescoço e carcinomas da bexiga e pulmão, podendo reagir com muitas estruturas celulares, tais como membranas, proteínas e RNA, porém o principal alvo é o DNA (ANTUNES; BIANCHI, 2004).

Diante disso, fica clara a necessidade de pesquisas na descoberta de ações abrangentes para o controle do câncer, com maior eficácia e menos efeitos colaterais. É nesse contexto que o desenvolvimento de novos compostos com potente atividade antitumoral vem sendo considerado uma das principais metas dos estudos medicinais atualmente.

1.5.2 A malária

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos aos seres humanos através de fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Anopheles*. Pode ser causada por quatro espécies de parasita: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*, sendo o último, responsável pela forma mais grave da malária, a cerebral, onde na maioria dos casos é fatal. Neste caso, o parasita compromete progressivamente o sistema nervoso central (SPILLMAN; KIRK, 2015; ANDERSON, 2005).

De acordo com o mais recente relatório mundial sobre a malária da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 584 mil pessoas morreram em 2013 e aproximadamente 3,2 milhões estejam em risco de infecção (OMS, 2014).

Segundo França e colaboradores (2008), o tratamento da malária é complexo, longo e muitas vezes ineficaz. Associado a isso, o combate da doença em países endêmicos é agravado por aspectos relacionados à educação da população de risco, controle do vetor ineficiente e ausência de políticas públicas efetivas. Além disso, o baixo índice terapêutico dos antimaláricos e algumas interações medicamentosas restringem a aplicação, comprometendo a eficácia do tratamento.

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40 e possuem seletividade e especificidade a cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium* (fármacos eritrocíticos, gametocíticos e esporonticidas). É importante destacar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, porém totalmente ineficazes contra outra, isto é, para cada espécie de plasmódio se utiliza um medicamento, ou associações de medicamentos, em dosagens adequadas à situação particular

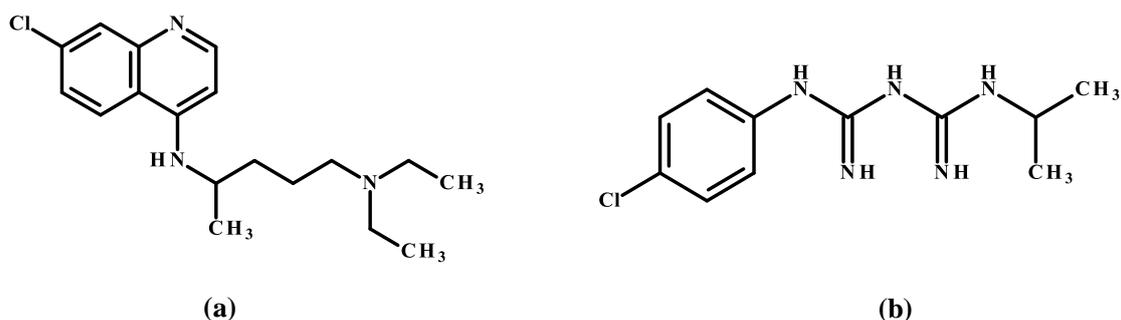
de cada enfermo (PIMENTEL, et al., 2007). A classificação dos principais antimaláricos é baseada no seu modo de ação, e são divididos em dois grandes grupos:

1. O primeiro grupo inclui a quinina, as aminoquinolinas e as acridinas. A quinina faz parte da família das quinolinas que incluem as 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. Estes compostos são ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*. Nesse grupo merece destaque a cloroquina (Figura 12a), uma das substâncias antimaláricas mais eficazes utilizadas para a supressão e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas. Considerada o fármaco de maior escolha nas últimas cinco décadas pela sua facilidade no uso, baixo custo e apresentar poucos efeitos colaterais no tratamento profilático da doença. Infelizmente, o uso profilático levou à resistência, fazendo com que esse fármaco se tornasse completamente inútil em algumas regiões. Quanto ao mecanismo de ação preciso das quinolinas, ainda não é completamente elucidado, porém existem hipóteses que seu modo de ação esteja associado à inibição da síntese de proteínas e interação com o DNA (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; FOLEY; TILLEY, 1998).

Nesse sentido, novos agentes antimaláricos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, utilizando como referência o núcleo das acridinas (DEMEUNYNCK, CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001; JONES, et al., 2009), que assim como as quinolinas são conhecidas como potentes agentes intercalantes, podendo inibir a transcrição do DNA em parasitas (GUETZOYAN, et al., 2009).

2. O segundo grupo inclui as pirimidinas (pirimetamina, trimetoprima) e biguanidas (proguanil e cicloguanil) e envolve a interferência na síntese do ácido tetraidrofólico, importante cofator no processo de síntese de DNA e de aminoácidos. Nesse grupo, destaca-se o proguanil (Figura 12b) que apresenta baixa toxicidade e vem sendo empregado como agente profilático. Esses fármacos antimaláricos têm sido estudados como possíveis ligantes aos sulcos do DNA (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; MCKEEVER; KAISER; ROZAS, 2013).

Figura 12- Agentes antimaláricos: a) cloroquina (grupo I); b) proguanil (grupo II).



Fonte: adaptado de FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008.

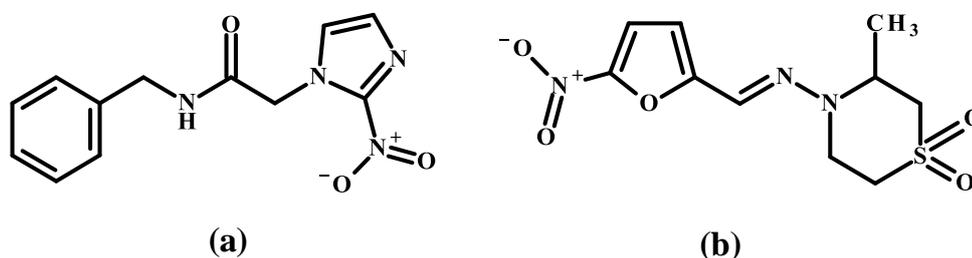
1.5.3 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é considerada uma das 17 doenças negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Essa doença resulta da infecção do parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae) provocando alta morbidade e mortalidade na América Latina, sendo a principal causa da cardiomiopatia infecciosa (FERREIRA, 2012; LANNES-VIEIRA, 2009).

Segundo Coura e Dias (2009), nas últimas três décadas a transmissão vetorial e transfusional da doença foi reduzida significativamente nas regiões endêmicas. Entretanto, essa doença não pode ser totalmente eliminada com os métodos atualmente disponíveis, devido às características epidemiológicas. Nesse contexto, para redução dos indícios e maior controle epidemiológico, devem ser realizadas abordagens educativas, vigilância entomológica (feita rotineiramente) e desenvolvimento de novas terapias mais eficientes e menos tóxicas para eliminação do protozoário (ROMANHA, et al., 2010).

Atualmente, o tratamento da doença de Chagas baseia-se no uso de quimioterápicos, empregando exclusivamente dois compostos nitro-heterocíclicos: o nifurtimox e benzonidazol (Figura 13a e 13b) descobertos nas décadas de 60 e 70, respectivamente (SOUZA, et al., 2011). Ambos os fármacos apresentam eficácia terapêutica limitada, devido à resistência de algumas cepas, a fase na qual a doença se encontra, dose, duração do tratamento e efeitos colaterais (PITA; PASCUTTI, 2011). Por haver diferença na eficácia em relação às cepas, o Nifurtimox, não é utilizado no Brasil, em razão da sua ineficácia e efeitos adversos, desta forma, se emprega o benzonidazol (FERREIRA, 2012).

Figura 13- Fármacos usadas na terapia da fase aguda da doença de Chagas: a) benzonidazol; b) Nifurtimox.



Fonte: adaptado de PITA; PASCUTTI, 2011.

Dessa forma, as limitações dos medicamentos disponíveis para a doença de Chagas justificam a busca de novos agentes tripanocidas que possam substituir as terapias atuais e/ou serem uma alternativa (SOUZA, et al., 2011).

A ação dos fármacos pressupõe a interação de uma molécula pequena (ligante) com uma macromolécula (receptor biológico), tipicamente uma proteína de alguma *via* bioquímica ou ácido nucléico (DIAS, et al., 2009). Assim, diversos estudos têm sido realizados para identificar vias metabólicas e alvos seletivos para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Dentre os alvos mais explorados, destacam-se o DNA e as enzimas topoisomerases I e II, responsáveis pelo processo de replicação (PITA; PASCUTTI, 2011; DIAS, et al., 2009; FERREIRA, 2012; CRIBB, 2010).

Nesse contexto, alguns trabalhos têm mostrado a importância de moléculas que interagem com o DNA e apresentam excelente atividade antitripanossoma, como por exemplo, as diamidinas aromáticas e seus análogos que se ligam ao sulco menor do DNA, principalmente em locais ricos em bases AT (PACHECO, et al., 2009; SILVA, et al., 2007; SOUZA, et al., 2011). Por fim, Dias e colaboradores (2009) demonstraram que complexos metálicos também apresentam propriedades interessantes de toxicidade e atividade tripanocida, sendo um de seus mecanismos de ação a interação com o DNA.

1.5.4 Leishmaniose

A leishmaniose, análoga à doença de Chagas, é considerada uma doença negligenciada e amplamente distribuída em todo mundo, que afeta o homem e os animais. É causada por protozoário parasita do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos (família *Psychodidae*) (BENÍTEZ, et al., 2013; RATH, et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), estima-se 1,3 milhões de novos casos e de 20.000 a 30.000 mortes anualmente, as quais estão distribuídas em 80 países. Atualmente são conhecidas três principais formas da doença: *i*) Leishmaniose visceral é a forma mais grave, podendo ser fatal caso não seja tratada; *ii*) Leishmaniose cutânea é a forma mais comum e provoca lesões na pele, úlceras, podendo levar a deficiência grave e por fim, a *iii*) Leishmaniose mucocutânea que leva a destruição parcial ou total das membranas das mucosas do nariz, boca e garganta (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Na ausência de controle de vetores e vacinas eficazes, o controle da doença é baseado principalmente em quimioterapia, que envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por *via* endovenosa. O tratamento tradicional apresenta vários inconvenientes, como as vias de aplicação (intramuscular ou endovenosa), frequência de administração dos fármacos e tempo do tratamento, o que acarreta desconforto ao paciente e alto custo (RATH, et al., 2003; SILVA-LÓPEZ, 2010).

O tratamento da leishmaniose vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e, estibogluconato de sódio, desenvolvidos há 50 anos

como medicamentos de primeira linha. Porém esses fármacos são tóxicos, ineficazes (em alguns casos) e por serem utilizados em tempo prolongado pode levar à resistência. Nessas situações a alternativa é usar medicamentos de segunda linha, tais como a anfotericina B ou a pentamidina, as quais são úteis aos pacientes que não responderam ao tratamento com antimoniais, são altamente eficazes e apresentam efeitos colaterais moderados, porém apresentam alta toxicidade (NOVA, 2008).

A pentamidina é uma diamidina aromática, que apresenta importante atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral e mostrou bons resultados em pacientes com leishmaniose e imunodepressão. O mecanismo de ação da pentamidina ainda não é completamente elucidado, mas as hipóteses indicam que interfere no transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA em regiões ricas nas bases AT (SILVA-LÓPEZ, 2010; NOVA, 2008; BRAY, et al., 2003).

Outro fármaco recentemente desenvolvido é a anfotericina B lipossomal, altamente eficaz, quase não tem efeitos colaterais, considerada o tratamento de primeira linha preferido para a doença visceral. Entretanto, possui alto custo, para ser amplamente utilizado pelos países em desenvolvimento (ADAM, et al., 2014).

Assim, os tratamentos atuais estão longe de ser satisfatórios, uma vez que a geração de mecanismos de resistência, a *via* de administração, tratamentos de longo prazo, alta toxicidade e o custo dos fármacos revelam a necessidade imediata para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos com atividade leishmanicida. Neste contexto, alguns trabalhos vêm desenvolvendo fármacos com maior eficácia, seletividade e menor toxicidade. Dentre eles destacam-se os trabalhos de Adam e colaboradores (2014), que desenvolveram uma nova série de cetonas triazolopiridil, as quais apresentaram excelente atividade leishmanicida, capazes de interagir com DNA, preferencialmente nos sulcos da biomolécula; e o de Benítez e colaboradores (2013), que buscaram desenvolver complexos metálicos, incluindo agentes intercalantes ao DNA, para atuar na terapia de doenças parasitárias, como a leishmaniose, tendo o DNA como principal alvo.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do que foi explanado quanto às doenças que possuem o DNA como principal alvo biológico, fica claro a importância de estudos utilizando estratégias/técnicas associadas à determinação de parâmetros quantitativos relacionados à interação com o DNA, visando selecionar candidatos a fármacos mais promissores, fazer o *screening* de moléculas, propor alterações estruturais no intuito de ampliar a atividade biológica desses compostos.

3 OBJETIVO GERAL DO ESTUDO PROPOSTO

Avaliar a interação entre três classes de compostos derivados das β -carbolinas, aldiminas e acridinas com DNA (*Calf thymus*), utilizando técnicas espectroscópicas e estudos teóricos, bem como a correlação com suas respectivas atividades biológicas, uma vez que tais moléculas apresentam excelente atividade frente a diversas patologias.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R., et al. Triazolopyridyl ketones as a novel class of antileishmanial agents. DNA binding and BSA interaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Espanha, v. 22, p.4018–4027, Jun., 2014.
- ALBANI, J.R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Estados Unidos: Blackwell Publishing, 2007.
- ALMEIDA, V. L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Brasil, v. 28, p. 118-129, Set., 2005.
- ANDERSON, A. C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. **Drug Discovery Today**, Estados Unidos, v. 10, p. 121-128, Jan., 2005.
- ANDRESSA BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, Brasil, v.15, p. 61-63, Out., 2003.
- ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 89-96, mar., 2004.
- ARAYA, F., et al. Capillary electrophoresis for studying drug–DNA interactions. **Methods**, v. 42, p.141–149, Set., 2007.
- ARJMAND, F.; JAMSHEERA, A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV). **Spectrochimica Acta Part A**, Índia, v. 78, p. 45–51, Jun., 2011.
- BALASUBRAMANIAN, S.; NEIDLE, S. G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. **Current Opinion in Chemical Biology**, Reino Unido, v.13, p. 345-353, Jun., 2009.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, In press, 2015.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Biophysical studies on curcumin–deoxyribonucleic acid interaction: Spectroscopic and calorimetric approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 62, p. 257– 264, Set., 2013.
- BAZZICALUPI, C., et al. Metals in supramolecular chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 417, p. 3–26, Mar., 2014.
- BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 31, p. 51-57, Jul., 2002.
- BENÍTEZ, J., et al. New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 62, p.20-27, Dez., 2013.

BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: A comparative spectroscopic and calorimetric study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Índia, v. 1810, p. 485–496, Jan., 2011.

BRAY, P. G., et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, Reino Unido, v.19, p. 232-239, Mai., 2003.

CAMPOS, E. C., et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. **European Journal of Pharmacology**, Brasil, v. 670, p.541–553, Set., 2011.

CHOI, Y. S., et al. Amine terminated G-6 PAMAM dendrimer and its interaction with DNA probed by Hoechst 33258. **Biophysical Chemistry**, República da Coréia, v. 121, p. 142–149, fev., 2006.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, Jun., 2009.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL. **Biologia Molecular: Princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CRIBB, P., et al. Trypanosoma cruzi TBP shows preference for C/G-rich DNA sequences in vitro. **Experimental Parasitology**, Argentina, v. 124, p. 346–349, Dez., 2010.

DANTAS, Maria Dayanne. **Avaliação da interação das proteínas do ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

DAR, A. M., et al. In vitro cytotoxicity and interaction of new steroidal oxadiazinanones with calf thymus DNA using molecular docking, gel electrophoresis and spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 148, p.340–350, Mai., 2015.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1703-1724, 2001.

DIAS, L. C., et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, Nov., 2009.

DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Investigation of the Interaction of Sertraline with Calf Thymus DNA by Spectroscopic Methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Iran, v. 24, p. 939-945, 2013.

DUVAL, P. A., et al. Caquexia em Pacientes Oncológicos Internados em um Programa de Internação Domiciliar Interdisciplinar. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Brasil, v. 56, p. 207-212, Mar., 2010.

FERREIRA, E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 4, p. 225-246, Jun., 2012.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. **Pharmacology & Therapeutics**, Austrália, v. 79, p. 55–87, 1998.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química Inorgânica na terapia do câncer. **Química Nova na Escola**, Brasil, v. 6, p. 13-18, Jul., 2005.

FOX, K. R. Targeting DNA with Triplexes. **Current Medicinal Chemistry**, Reino Unido, v. 7, p. 17-37, 2000.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, p. 1271-1278, Abr., 2008.

GARCIA, M. H., et al. New ruthenium(II) mixed metallocene derived complexes: Synthesis, characterization by X-ray diffraction and evaluation on DNA interaction by atomic force microscopy. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 363, p. 3765–3775, Jun., 2010.

GARRETT, R. H.; GRISHMAN, C. M. **Biochemistry**. 5. ed. Austrália: Brands Brooks/Cole - Cengage Learning, 2012.

GUETZOYAN, L., et al. Antimalarial acridines: Synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hemozoin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, França, v. 17, p. 8032–8039, Out., 2009.

GUO, H., et al. Multi-spectroscopic method study the interaction of anti-inflammatory drug ketoprofen and calf thymus DNA and its analytical application. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v. 79, p. 92–96, Fev., 2011.

HAQ, I. Thermodynamics of drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Reino Unido, v. 403, p. 1–15, Abr., 2002.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D.R. **Lippicott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. 5.ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, 2011.

HASSAN, M. F.; RAUF, A. Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives of fatty acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Índia, v. 153, p. 510–516, Jan., 2015.

HUBER, C. P., et al. Glicoproteína-P, Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, Brasil, v. 33, p. 2148-2154, Ago., 2010.

ILANCHELIAN, M.; RAMARAJ, R. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 162, p. 129–137, Jul., 2004.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>, acesso em 15 de setembro de 2015.

ISLAM, M. M., et al. Thermodynamics and kinetic studies in the binding interaction of cyclic naphthalene diimide derivatives with double stranded DNAs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Japão, v. 23, p. 4769–4776, Jun., 2015.

JANGIR, D. K., et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 114, p. 38–43, Mai., 2012.

JAUMOT, J.; GARGALLO, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, Espanha, v. 18, p. 1900-1916, 2012.

JONES, M., et al. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin–acridine hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Irlanda, v. 19, p. 2033–2037, Fev., 2009.

KHAN, G. S., et al. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Nova Zelândia, v. 115, p. 105–118, Jul., 2012.

KOMOROWSKA, M. A.; OLSZTYŃSKA-JANUS, S. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. Índia: In Tech, 2011.

KOOLMAN, J.; ROEHMAN, K. H. Color Atlas of Biochemistry. 2. ed. Alemanha: Thieme Stuttgart, 2005.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.

LANNES-VIEIRA, J., et al. Chronic Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 226-235, Ju., 2009.

LEHN, J.M. **Química supramolecular conceitos e perspectivas**. Lisboa: Press, 1996.

LING, X., et al. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v. 93, p. 172–176, Ago., 2008.

MA, D., et al. Molecular modeling of drug-DNA interactions: Virtual screening to structure-based design. **Biochimie**, China, v. 93, p. 1252-1266, Abr., 2011.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, Brasil, v. 23, p. 237-243, Jul., 2000.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. **Current Medicinal Chemistry**, México, v. 12, p. 127-151, 2005.

MCKEEVER, C.; KAISER, M.; ROZAS, I. Aminoalkyl Derivatives of Guanidine Diaromatic Minor Groove Binders with Antiprotozoal Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Irlanda, v. 56, p. 700-711, Jan., 2013.

MEYERS, R. A. **Encyclopedia of Physical Science and Technology**. 3.ed. Estados Unidos: Academic Press, 2002.

MOHAMADI, M., et al. Spectroscopic and electrochemical studies of the interaction between oleuropein, the major bio-phenol in olives, and salmon sperm DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Iran, v. 148, p. 260–265, Abr., 2015.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, Espanha, v.156, p.141–149, Ago., 2014.

MORIYAMA, R.; IWASAKI, Y.; MIYOSHI, D. Stabilization of DNA Structures with Poly(ethylene sodium phosphate). **The Journal of Physical Chemistry B**, Japão, v. 119, p. 11969-11977, Jul., 2015.

MURRAY, R. K., et al. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26. ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

NAKAMOTO, K.; TSUBOI, M.; STRAHAN, G. D. **Drug–DNA Interactions: Structures and Spectra**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

Nobel Prize, disponível em:

<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/press.html>, acesso em 08 de outubro de 2015.

NOVA, Nadja Soares Vila. **Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de Annonaceae do Estado de Ceará**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2008.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, Brasil, v. 25, p. 976-984, Fev., 2002.

Organização Mundial da Saúde, disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>, acesso em 10 de setembro de 2015.

Organização Mundial da Saúde, disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>, acesso em 10 de setembro de 2015.

PACHECO, M. G. O., et al. Trypanosoma cruzi: Activity of heterocyclic cationic molecules in vitro. **Experimental Parasitology**, Brasil, v. 123, p. 73–80, Jun., 2009.

PASSOS, Esdras Duarte. **Síntese e Caracterização de Microesferas Ferromagnéticas para Utilização em Hipertermia**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 2006.

PAXTON, J. Topics on drug metabolism. Croácia: In Tech, 2012.

PIMENTEL, L. F., et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brasil, v. 43, p. 503-514, Ago., 2007.

PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotona Redutase como Foco. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 3, p. 307-324, Out., 2011.

POLICARPI, Everton de Britto. **Síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de novos complexos de cobre(II) com o ligante “DPPZ”**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, França, v. 89, p. 43–61, Jul., 2014.

RATH, S., et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, Brasil, v. 26, p. 550-555, Jan., 2003.

RAUF, S., et al. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Austrália, v. 37, 205–217, Dez., 2005.

REHMAN, S. U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v. 576, p. 49-60, Mai., 2015b.

REHMAN, S.U., et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.566, p.7–14, Jan., 2015a.

ROMANHA, A. J., et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 233-238, Mar., 2010.

ROSU, F.; PAUW, E.; GABELICA, V. Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. **Biochimie**, Bélgica, v. 90, p. 1074-1087, Jan., 2008.

SALVIA, M., et al. Thiazotropsin aggregation and its relationship to molecular recognition in the DNA minor groove. **Biophysical Chemistry**, México, v.179, p. 1–11, Abr., 2013.

SARWAR, T., et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 73, p. 9–16, Nov., 2015.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.

SAWADA, N. O., et al. Quality of life evaluation in cancer patients to submitted to chemotherapy. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, Brasil, v. 43, p. 578-584, Jun., 2009.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Iran, v. 96, p. 278–283, Mai., 2012.

SHEN, H., et al. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, China, v. 6, p. 532-547, Mar., 2011.

SIDDIQUI-JAIN, A., et al. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. **Applied Biological Sciences**, Tucson, v. 99, p. 11593-11598, Set., 2002.

SILVA, C. F., et al. Activity of “reversed” diamidines against *Trypanosoma cruzi* “in vitro”. **Biochemical Pharmacology**, Brasil, v. 73, p. 1939-1946, Mar., 2007.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, Jun., 2010.

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J. S. Tandem Mass Spectrometry for Characterization of Covalent Adducts of DNA with Anticancer Therapeutics. **Mass Spectrometry Reviews**, Texas, v. 32, p. 247-266, Nov., 2012.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v.124, p.1–19, Abr., 2013.

SOUZA, E. M. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, Brasil, v. 127, p. 429–435, Nov., 2011.

SPILLMAN, N. J.; KIRK, K. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Austrália, v. 5, p. 149-162, Jul., 2015.

SUN, H., et al. A stabilizing and denaturing dual-effect for natural polyamines interacting with G-quadruplexes depending on concentration. **Biochimie**, China, v. 93, p. 1351-1356, Jun., 2011.

SUN, Y., et al., Studies of interaction between two alkaloids and double helix DNA. **Journal of Luminescence**, China, v. 156, p. 108–115, Ago., 2014.

THIEMANN, O. H. A descoberta da estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick. **Química Nova na Escola**, Brasil, v. 17, p. 1-7, Mai., 2003.

TRUFELLI, D. C., et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, p. 72-76, Set., 2008.

VIDAL, Maria Luiza Bernardo. **Efeitos adversos tardios subsequentes ao tratamento radioterápico para câncer de colo uterino na bexiga, reto e função sexual**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 136, p. 321–326, Out., 2015.

WANUNU, M.; TOR, Y. **Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions**. Estados unidos: CRC Press, 2012.

WEI, R.; WANG, J.; ZHANG, M. Spectroscopic study on the binding of porphyrins to (G₄T₄G₄)₄ parallel G-quadruplex. **Biophysical Chemistry**, China, v.148, p. 51–55, Fev., 2010.

WHEATE, N. J., et al. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Austrália, v.7, p. 627-648, Jul., 2007.

WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v.79, p.1202– 1209, Abr., 2011.

YAKIMCHUK, K. Protein Receptor Ligand Interaction/Binding Assays. **Labome the world of laboratories**, Suécia, <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.1.199>, 2011.

ZHANG, Y., et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 163, p. 1345–1352, Ago., 2009.

ZHANG, Y.; HUANG, K. The influence of the hydrated metal cations binding to adenine-N7 or adenine-N3 on the hydrogen bonding in adenine–thymine base pair: A comparative study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, China, v. 822, p. 57–64, Jul., 2007.

ZHAO, T., et al. In vitro studies on the behavior of salmeterol xinafoate and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 132, p. 198–204, Mai., 2014.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M Ω cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA).

O DNA (*Calf thymus*, ctDNA)¹ tipo I na forma de fibras (Sigma) foi empregado nos estudos de interação. Este DNA é preparado a partir de tecido do timo de vitela de gênero não especificado. Para o preparo da solução de ctDNA, foram pesados entre 1,0-2,0 mg (SHAHABADI; MOGHADAM, 2012) do ácido nucleico e solubilizou-se em tampão Tris (50 mM, pH = 7,40) contendo NaCl (100 mM), para os ensaios com os alcaloides β -carbolínicos e aldiminas; e para as acridinas empregou-se tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40). Em seguida, as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, sob refrigeração a 4°C. Após 24 h, foram levadas a um banho de ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil), por 30 min, para garantir uma melhor solubilidade do DNA e conseqüentemente a homogeneidade da solução (SAVARIZ, et al., 2014).

A solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹ empregada para ajuste da força iônica foi preparada a partir da dissolução de 2,9223 g de cloreto de sódio (Vetec) em água ultrapura, transferiu-se a mesma para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

Para o preparo da solução tampão Tris (50 mM, pH = 7,40) pesou-se 1,5142 g de Tris (Sigma) e solubilizou-se em água ultrapura. Retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução de NaCl (1,0 mol L⁻¹) e adicionou-se à solução tampão. O ajuste do pH para 7,40 foi realizado com uma solução de HCl. Em seguida, transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 250 mL.

Para o preparo da solução tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40) pesou-se 0,3549 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Dinâmica) e solubilizou-se em água ultrapura. Ajustou-se o pH para 7,40 com uma solução de HCl. O sistema resultante foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL avolumando-se com água ultrapura.

Como já mencionado, os derivados purificados das β -carbolinas, aldiminas e acridinas, foram empregados para os estudos de interação com o ctDNA. Os derivados de alcaloides β -carbolínicos foram cedidos pela Prof^a Maria Helena Sarragiotto do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá; as aldiminas pelo Prof. Ângelo de Fátima do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais; e as acridinas pelo Prof. Thiago Mendonça de Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade

¹É considerado o tipo de DNA de maior escolha nos estudos de interação devido à similaridade com o DNA de placenta humana, obtendo-se as seguintes proporções das bases (ctDNA/DNA placenta humana): AT (58,1 %), CG (41,9 %); AT (58%), CG (42%), respectivamente.

Federal de Alagoas. Estes compostos foram sintetizados pelos respectivos grupos de pesquisa e já tem suas rotas sintéticas determinadas e otimizadas, assim como a completa e inequívoca caracterização física baseada em técnicas espectroscópicas (infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas) (SAVARIZ, et al., 2014; SILVA, 2013). De forma geral, para o preparo da solução estoque destes compostos, pesou-se 1,0 mg e solubilizou-se em 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Após o preparo, as soluções estoques foram armazenadas em tubo criogênico (2 mL), sob refrigeração a 4°C (SILVA, et al., 2016).

Para o preparo da solução de tiosulfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pesou-se 0,1581 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Synth), com posterior solubilização em água ultrapura para 10 mL.

Para o preparo da solução estoque de KI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pesou-se 2,4900 g de KI (Sigma) e solubilizou-se em água ultrapura. Retirou-se uma alíquota de 2,5 mL da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e adicionou-se à solução de KI e a solução final foi avolumada para 50 mL com água ultrapura.

Para o preparo da solução estoque de brometo de etídio (2,0 mM) foi pesado 0,0016 g do brometo de etídio (Sigma) e solubilizado com água ultrapura em tubo criogênico (2,0 mL). Para o preparo da solução estoque de acridina orange (2,0 mM) foi pesado 0,0012 g da acridina (Sigma) e solubilizado em água ultrapura (2,0 mL). Para o preparo da solução estoque berenil (2,0 mM) foi pesado 0,0023 g do berenil (Sigma) e solubilizado em água ultrapura (2,0 mL). Todas as diluições posteriores foram realizadas no tampão utilizado para cada classe de composto.

2.2 Equipamentos utilizados

Nos estudos de interação empregando os alcaloides β -carbolínicos e acridinas, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo e plástico (polimetil metacrilato, transparência na faixa 220-900 nm) com capacidade de 4 e 2 mL, respectivamente, ambas com 10 mm de caminho óptico. Nos ensaios empregando as aldiminas, as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro com leitor de microplacas (EnSpire[®], Perkin Elmer, Alemanha) equipado com lâmpada de xenônio, empregando microplacas de 96 poços de 200 μL .

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Para as medidas de pH utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg e balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg. Nos estudos de avaliação da temperatura de desnaturação (T_m) do ctDNA, as amostras foram aquecidas utilizando um banho sistema de aquecimento modelo SP12/200ED (SPlabor, Brasil).

2.3 Procedimentos

2.3.1 Determinação da concentração do ctDNA (*Calf thymus*)

A concentração da solução estoque de ctDNA foi determinada com base no coeficiente de extinção de 6600 L mol^{-1} a partir do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção de 1:100. Para avaliar se a solução de ctDNA estava livre de proteínas, calculou-se a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), obtendo valores entre 1,8-1,9 (SAVARIZ, et al., 2014).

2.3.2 Interação ctDNA-ligante por fluorescência

Para todas as classes de compostos avaliadas nesse trabalho, as titulações espectrofluorimétricas foram executadas mantendo-se constante a concentração do ligante e variando-se progressivamente a quantidade de ctDNA de acordo com cada classe avaliada, enquanto por UV-Vis, avaliou-se o sinal de absorvância do composto na ausência e na presença do ctDNA, bem como a absorvância do ctDNA livre (Tabela 1). Após o tempo de incubação (60 min) as medidas analíticas foram realizadas a temperatura ambiente, exceto para as aldíminas onde esse ensaio foi realizado em três temperaturas (22, 30 e 38°C) utilizando os seguintes parâmetros instrumentais no leitor de microplacas: altura (h) de 6,3 mm e número de *flashes* igual a 200.

2.3.3 Estudo realizado com iodeto de potássio (KI)

A avaliação do modo de ligação dos compostos com o ctDNA, foi realizado por fluorescência molecular, mantendo-se constante a concentração dos compostos e aumentando a concentração de iodeto de potássio na presença e ausência de ctDNA (Tabela 1).

2.3.4 Ensaio de competição com brometo de etídio (BE) e acridina orange (AO)

Neste ensaio manteve-se constante a concentração de BE/AO e de ctDNA, e adicionaram-se quantidades crescentes dos compostos avaliados (Tabela 1). Para os

compostos β -carbolínicos e aldiminas, utilizou-se como sonda o brometo de etídio, somente para a classe das acridinas foi utilizado a AO.

2.3.5 Avaliação da temperatura de desnaturação

Nos estudos de avaliação da temperatura de desnaturação (T_m) do ctDNA, as amostras foram aquecidas lentamente na faixa de 40 a 100 °C e os valores de absorvância foram monitorados a 260 nm para o ctDNA na presença e na ausência dos compostos (Tabela 1) (SUN, et al., 2014). Esse ensaio foi realizado somente para a classe de compostos β -carbolínicos.

2.3.6 Avaliação da transferência de energia por contato

Nesse ensaio foram realizados espectros de excitação e absorção dos compostos avaliados, e das sondas berenil e acridina orange na ausência e na presença do ctDNA, bem como do ctDNA livre no intervalo de 200-350 nm. A concentração dos compostos/sondas foi de 10 μ M e 100 μ M para o ctDNA. Parâmetros instrumentais empregando fluorescência molecular foram estabelecidos como λ_{em} (composto/berenil) = 460 nm e λ_{em} (AO) = 525 nm. Essa avaliação foi realizada apenas para a classe das acridinas (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

2.3.7 Ensaios biológicos

Os derivados β -carbolínicos foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa frente a sete linhagens de células tumorais humanas, sendo estas: mama (MCF-7), ovário resistente (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29), próstata (PC-3) e melanoma (UACC-62), obtidas junto ao Frederick Cancer Research & Development Center – National Cancer Institute - Frederick, MA, USA. Todos os compostos foram avaliados em triplicata, utilizando como controle positivo o quimioterápico doxorubicina e a concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) foi determinada por meio da análise de regressão linear da curva dose-resposta para cada linhagem celular, sendo os compostos com $IC_{50} > 100\mu$ M considerados inativos. A síntese, caracterização e resultados biológicos destas moléculas foram publicadas recentemente (SAVARIZ, et al., 2014).

As aldiminas foram testadas quanto a sua atividade antiproliferativa frente às mesmas linhagens anteriores, acrescentando a VERO (célula epitelial renal de macaco). A síntese, caracterização e resultados biológicos destas moléculas foram publicadas recentemente (SILVA, 2013).

As acridinas foram avaliadas quanto a sua atividade antimalárica frente à linhagem de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2), utilizando como controle positivo células hospedeiras de hepatoma humano (HepG2). Cada composto foi inicialmente testado a uma concentração de 10 μ M, em triplicata, e os valores de IC₅₀ foram obtidos usando no mínimo cinco concentrações. A partir da razão entre a dose tóxica para 50% das células e sua atividade anti-*P. falciparum* foi possível obter o índice de seletividade dessas moléculas.

2.3.8 Tratamento dos dados

Após a aquisição dos dados, todos os resultados foram tratados empregando o programa Originlab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2010 (Microsoft Office), onde foi possível obter informações para o cálculo dos parâmetros de ligação dos compostos ao ctDNA.

Tabela 1- Concentrações utilizadas nos ensaios realizados para cada classe de compostos avaliada.

CLASSE	Concentrações utilizadas				
	Titulação fluorimétrica	KI	BE	AO	UV-Vis
β-carbolínicos	$C_{\text{composto}} = 5 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 2,5 \text{ a } 500 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 5 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 50 \mu\text{M}$ $C_{\text{KI}} = 5 \text{ a } 150 \text{ mM}$	$C_{\text{BE}} = 2 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 6 \mu\text{M}$ $C_{\text{composto}} = 15 \text{ a } 120 \mu\text{M}$	-	$C_{\text{composto}} = 10 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 100 \mu\text{M}$
Aldiminas	$C_{\text{composto}} = 20 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 1,6 \text{ a } 40 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 20 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 13,3 \mu\text{M}$ $C_{\text{KI}} = 10 \text{ a } 125 \text{ mM}$	$C_{\text{BE}} = 10 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 100 \mu\text{M}$ $C_{\text{composto}} = 2,5 \text{ a } 20 \mu\text{M}$	-	$C_{\text{composto}} = 10 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 60 \mu\text{M}$
Acridinas	$C_{\text{composto}} = 10 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 10 \text{ a } 300 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 5 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 50 \mu\text{M}$ $C_{\text{KI}} = 5 \text{ a } 150 \text{ mM}$	-	$C_{\text{AO}} = 2 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 6 \mu\text{M}$ $C_{\text{composto}} = 5 \text{ a } 60 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 25 \mu\text{M}$ $C_{\text{ctDNA}} = 6,25 - 300 \mu\text{M}$

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

2.4 Docking molecular

Os estudos por *docking* molecular foram realizados em colaboração com o professor Thiago Mendonça de Aquino apenas para as classes dos derivados β -carbolínicos e acridinas.

Assim, as estruturas desses compostos foram primeiramente tratadas com base na teoria semi-empírica ao nível PM3 usando o software *ArgusLab* v. 4.0.1. As estruturas otimizadas com a menor energia foram utilizados para os cálculos de *docking* molecular, devido a sua maior estabilidade.

As ferramentas *MGL 1.5.4* com *AutoGrid4* e *AutoDock4* foram usadas para criar e executar cálculos de encaixe entre as moléculas e a sequência de DNA selecionada. A estrutura do dodecamero (CGCGAATTCGCG)₂¹(PDB ID: 1BNA) foi empregada como modelo de DNA. A mesma foi obtida a partir do *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Arquivos do receptor (DNA) e ligantes (derivados β -carbolinas/acridinas) foram fornecidos usando as ferramentas *AutoDock*. O receptor foi tratado como uma molécula rígida, enquanto que os ligantes foram tratados como flexíveis o que significa que todas as torções que não fossem de anéis foram mantidas (DELANO, 2002).

Os heteroátomos, incluindo moléculas de água foram excluídos (SHI, et al., 2015). Os átomos de hidrogênio polares foram adicionados nas moléculas de DNA. Em seguida, as cargas parciais atômicas do DNA e dos derivados β -carbolínicos/acridinas foram calculados utilizando os métodos *Gasteiger Marsili* e *Kollman*, respectivamente. O DNA foi colocado dentro de uma caixa com coordenadas atômicas nos sentidos $x \times y \times z$, $94 \times 104 \times 126$ e um espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$. Foram utilizados para realizar cálculos de docagem molecular, como implementado no *AutoDock*, algoritmos genéticos lamarckianos (SHAHABADI; FILI; KHEIRDOOSH, 2013). O número de algoritmo genético executado e o número de avaliações foram definidos para 100 e 2,5 milhões, respectivamente. Todos os outros parâmetros utilizados foram com configurações padrão do programa. Para cada um dos processos de docagem, a conformação de menor energia foi selecionada como o modo de ligação, de acordo com a função de escore do *AutoDock*. Os dados obtidos com *AutoDock* foram interfaceados com *PyMOL*.

Os modelos moleculares foram construídos para discutir os modos de ligação por docagem usando o programa *AutoDock* para as interações dos derivados β -carbolínicos/acridinas com múltiplos fragmentos de DNA (SHAHABADI; FILI;

¹ Modelo de DNA utilizado nos estudos de *docking* molecular devido ao número de bases, baseado no trabalho de Shahabadi e colaboradores (2013).

KHEIRDOOSH, 2013). O complexo resultante foi utilizado para calcular os parâmetros de energia que podem justificar os resultados espectroscópicos (ARJMAND, et al., 2012). Para melhor precisão nos resultados, os cálculos de energia usando *AutoDock Vina* foram realizadas a partir das 20 conformações mais importantes para cada derivado β -carbolina/acridina estudado (TROTT; OLSON, 2010). A partir dos cálculos *Vina*, o confômero com energia de ligação mínima foi escolhido a partir de 1 mínimo de energia conformacional (desvio de mínimos quadrados; RMSD = 0,0) a partir de 20 corridas (SHAHABADI; FILI; KHEIRDOOSH, 2013).

REFERÊNCIAS

- ARJMAND, F., et al. Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of Cu^{II} - Sn^{IV} heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, França, v. 49, p. 141-150, Jan., 2012.
- DeLano, W. L., The PyMOL User's Manual, DeLano Scientific, CA, **2002**.
- PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, Estados Unidos, v. 18, p. 497-503, Nov., 2007.
- SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.
- SHAHABADI, N.; FILI, S. M.; KHEIRDOOSH, F. Study on the interaction of the drug mesalamine with calf thymus DNA using molecular docking and spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Iran, v.128, p. 20–26, Ago., 2013.
- SHI, J. H., et al. Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: Spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 136, p.443–450, Set., 2015.
- SUN, Y., et al. Studies of interaction between two alkaloids and double helix DNA. **Journal of Luminescence**, China, v.156, p.108–115, Ago., 2014.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, Califórnia, v. 31, p. 455- 461, Abr., 2010.

3 ARTIGO 1- DERIVADOS β -CARBOLÍNICOS¹

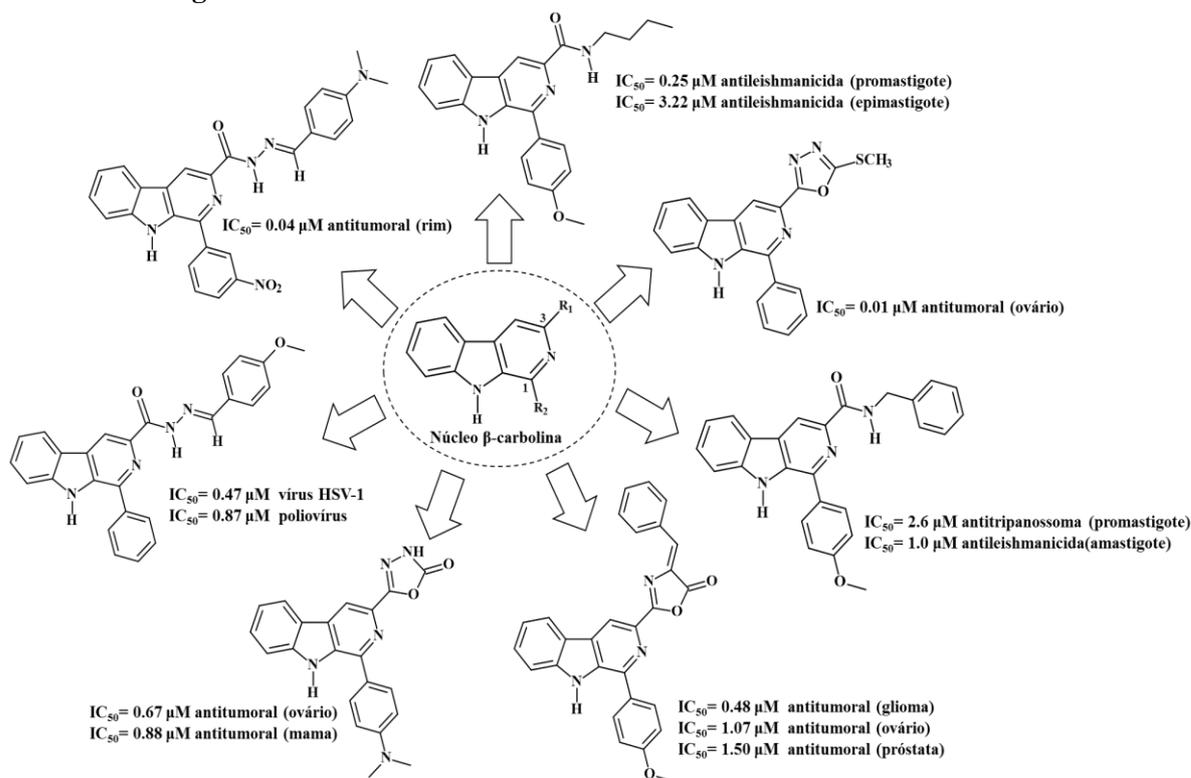
3.1 Introdução

Os compostos β -carbolínicos são um grupo abrangente de alcaloides indólicos naturais e sintéticos que possuem em comum um anel tricíclico pirido[3,4-b]indol em sua estrutura, essas moléculas podem ser classificadas de acordo com a saturação do anel de seis membros contendo nitrogênio (CAO, et al., 2007). Estudos indicam que estes alcaloides possuem diversas ações farmacológicas, dentre elas, ação anticonvulsiva, antiviral, antitumoral, antiproliferativa e atividade antimicrobiana (CAO, et al., 2007; HERRAIZ; GALISTEO, 2015; SARKAR; BHADRA, 2014; KHAN, et al., 2013; PATEL, et al., 2012). Além disso, atuam como agentes intercalantes ao DNA e são capazes de inibir as enzimas Topoisomerases I e II (GUAN, et al., 2006; DEVEAU, et al., 2001; XIN, et al., 2012), as quais são responsáveis por regular processos como transcrição, replicação e recombinação do DNA (SRIDEVI, et al., 2015; WEBB; EBELER, 2003).

Diante das diferentes atividades demonstradas por essas moléculas, o grupo de pesquisa de Produtos Naturais Estrutura, Conformação e Atividade Biológica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) tem nos últimos anos, sintetizado e avaliado atividade biológica de compostos β -carbolínicos com diferentes padrões de substituição na posição 1 e 3 do anel tricíclico. O Esquema 1 apresenta uma compilação de alguns trabalhos desse grupo destacando compostos com diferentes atividades biológicas (BARBOSA, et al., 2011; TONIN, et al., 2010; FORMAGIO, et al., 2008; PEDROSO, et al., 2011; SAVARIZ, et al., 2012; SAVARIZ, et al., 2014; FORMAGIO, et al., 2009).

¹ Esta seção foi transformada em dois artigos, onde as capas dos mesmos encontram-se na seção 8.

Esquema 1- Compostos β -carbólicos selecionados que foram sintetizados pelo grupo de Produtos Naturais Estrutura, Conformação e Atividade Biológica (UEM) e respectivas atividades biológicas.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Alguns trabalhos com enfoque em outras classes de compostos vêm tentando estabelecer a existência da relação entre os valores das constantes de ligação com DNA (K_b) e parâmetros de atividade *in vitro* para algumas doenças que possuem o DNA como alvo, visando avaliar o mecanismo de ação responsável pela atividade biológica (MCKEEVER; KAISER; ROZAS, 2013; RODRIGUEZ, et al., 2008; DZIEGIELEWSKI, et al., 2002).

Neste sentido, vale destacar estudos com derivados aminoalquilguanidinas diaromáticas com atividade antiprotozoária (malária) que apresentaram coeficiente de correlação (r , coeficiente de Pearson) igual a 0,9327 para relação entre K_b e IC_{50} (MCKEEVER; KAISER; ROZAS, 2013). Nesta mesma linha, foram avaliadas as correlações quanto a atividade antitripanossomal e o valor de K_b (interação com DNA) obtendo-se 0,9056 para derivados bis(2-aminoimidazolina) e, 0,5994 quanto aos derivados bisguanidina (RODRIGUEZ, et al., 2008). Estes dados indicam a contribuição da interação com o DNA para o entendimento do mecanismo de ação desses compostos. Contudo, este comportamento não pode ser generalizado, visto que, outros mecanismos também são passíveis de ocorrer, como observado para derivados imidazo acridinonas, que atuam como agentes antitumorais e apresentaram baixa correlação entre K_b e IC_{50} ($r = 0,07$) (DZIEGIELEWSKI, et al., 2002).

De maneira geral, foi observado que os estudos com compostos β -carbolínicos com atividade biológica não apresentam um enfoque quantitativo (determinação da constante de ligação, parâmetros termodinâmicos e modo de ligação) em relação à interação com DNA. Estes, de forma geral, se limitam a avaliar o processo de interação baseado apenas em mudanças espectrais (UV-Vis ou fluorescência) na ausência e presença de DNA (CHEN, et al., 2010a; CHEN, et al., 2010b; CAO, et al., 2005).

Desta forma, em virtude da atividade antitumoral significativa de derivados com núcleo das β -carbolinas já demonstrada em vários estudos, o objetivo principal do presente trabalho é avaliar a interação de forma quantitativa entre doze compostos sintéticos derivados da classe de alcalóides β -carbolínicos com DNA (*Calf thymus*, ctDNA), buscando correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com o IC_{50} de sete linhagens celulares tumorais avaliadas, visando inferir sobre o possível mecanismo de ação, quando possível, dos compostos frente à atividade antiproliferativa.

3.2 Objetivos Específicos

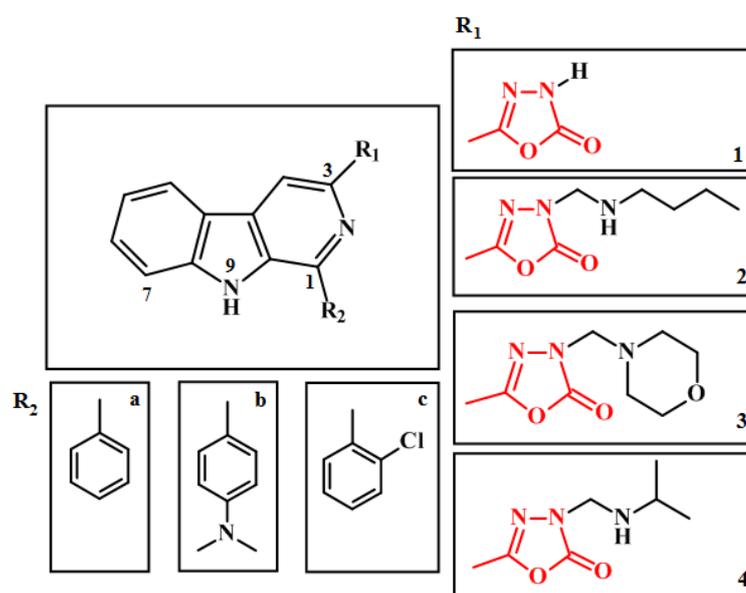
- a) Empregar técnicas de fluorescência molecular para avaliar a interação entre doze derivados β -carbolínicos e ctDNA (*Calf thymus*) simulando condições fisiológicas, e obter parâmetros como: constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constantes de ligação (K_b), estequiometria DNA-ligante (n) e energia livre de Gibbs (ΔG);
- b) Explorar a técnica UV-Vis visando avaliar o mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação;
- c) Determinar o modo de ligação DNA-ligante, por meio de ensaios com o iodeto de potássio e estudos de competição com brometo de etídio;
- d) Realizar estudo de desnaturação térmica visando confirmar o modo de ligação DNA-ligante;
- e) Realizar experimentos de *docking* molecular para os derivados mais ativos, a fim de confirmar os resultados experimentais, prevendo o modo de ligação, bem como a energia de ligação relativa ao complexo formado entre os compostos β -carbolínicos e ctDNA;
- f) Correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com os valores de IC_{50} , buscando relacionar a interação com ctDNA e inferir sobre o mecanismo de ação da atividade antiproliferativa.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Considerações iniciais

As estruturas dos compostos β -carbolínicos avaliados estão apresentadas no Esquema 2, onde o núcleo básico dessas moléculas foi substituído em dois pontos do anel aromático nitrogenado, nos carbonos 1 e 3. Dessa forma o composto **1a**, por exemplo, tem na sua estrutura o radical $R_1 = \mathbf{1}$ e o radical $R_2 = \mathbf{a}$, e a mesma lógica se aplica as demais moléculas. A síntese e caracterização estrutural destes compostos foram publicadas recentemente (SAVARIZ, et al., 2014).

Esquema 2- Estruturas dos compostos β -carbolínicos avaliados.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Dentre os compostos avaliados o **3b** (Esquema 2) foi o que apresentou a maior constante de interação com ctDNA, assim este composto foi empregado como modelo para apresentação dos resultados.

3.3.2 Avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular

Nos estudos empregando fluorescência molecular foi observado que todos os compostos avaliados apresentaram emissão na faixa de 410 a 430 nm quando excitados entre 280-286 nm. Assim, em função desta característica espectroscópica (capacidade de fluorescer) os compostos β -carbolínicos foram titulados com ctDNA. Foi observado que ao se adicionar ctDNA ao sistema, ocorreu redução gradual da intensidade de fluorescência intrínseca dos compostos. Este processo se deu em função da diminuição da concentração

livre dos mesmos, indicando qualitativamente que os compostos apresentam interação com o ácido nucleico por meio da formação do complexo supramolecular não fluorescente alcaloide-ctDNA (SHI, et al., 2015). A Figura 1a apresenta o perfil espectral obtido para o composto 3b, comportamento similar foi observado para os demais derivados β -carbolínicos avaliados.

Em virtude da variação na fluorescência intrínseca do composto ao se adicionar quantidades crescentes de ctDNA é possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante de ligação (K_b), entre o composto de interesse (ligante) e a macromolécula (ctDNA).

Dessa forma, para determinar o valor da constante de Stern-Volmer, empregou-se a seguinte equação:

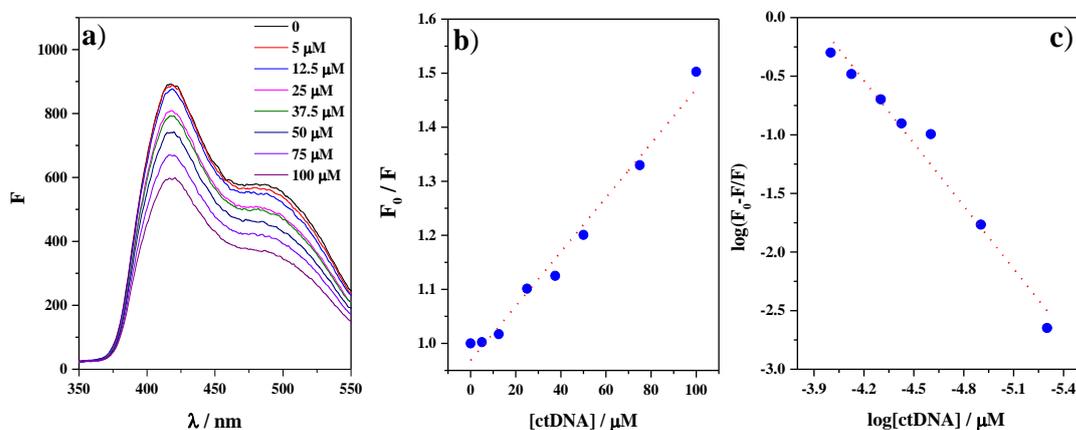
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Equação (3)}$$

a qual já foi descrita anteriormente. A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) do complexo supramolecular formado entre os compostos avaliados e ctDNA foi realizada a partir de uma titulação fluorimétrica (PLSIKOVA, et al., 2012). Estes parâmetros foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (4)}$$

Os valores de K_b e n são obtidos a partir da curva de $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[ctDNA]$. As Figuras 1b e 1c apresentam os perfis das curvas para o composto 3b a partir da linearização das equações (1) e (2), respectivamente. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para essa avaliação.

Figura 1- Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular .a) Perfil espectral do composto 3b (5,0 μ M) com adição de incrementos crescentes de ctDNA; b) Gráfico de Stern–Volmer para o composto 3b (processo de quenching); c) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto 3b com o ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Tris–HCl 50 mM e 100 mM NaCl) a 30 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Tabela 1- Parâmetros de interação do ctDNA com os compostos β -carbolínicos a 30 °C.

Compostos	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de Ligação			Parâmetros Termodinâmicos
	$K_{SV} (10^3 \text{ L mol}^{-1})$	r	$K_b (10^4 \text{ L mol}^{-1})$	n	r	$\Delta G (\text{kJ mol}^{-1})^a$
1a	4,21 \pm 0,38	0,9880	7,76 \pm 0,01	1,32 \pm 0,05	0,9985	- 27,89
1b	4,26 \pm 0,04	0,9835	39,8 \pm 0,01	1,51 \pm 0,10	0,9928	- 31,95
1c	4,69 \pm 0,16	0,9961	0,95 \pm 0,01	1,07 \pm 0,09	0,9854	- 22,69
2a	1,94 \pm 0,01	0,9896	0,19 \pm 0,01	0,99 \pm 0,10	0,9955	- 18,70
2b	56,5 \pm 3,8	0,9910	72,4 \pm 0,02	1,22 \pm 0,27	0,9550	- 33,43
2c	8,20 \pm 1,79	0,9358	0,033 \pm 0,001	0,66 \pm 0,16	0,9486	- 14,37
3a	1,76 \pm 0,04	0,9965	0,063 \pm 0,001	0,88 \pm 0,02	0,9967	- 15,97
3b	5,09 \pm 0,36	0,9901	182 \pm 1	1,63 \pm 0,07	0,9968	- 35,71
3c	3,82 \pm 0,17	0,9901	10,72 \pm 0,07	1,40 \pm 0,01	0,9993	- 28,69
4a	5,02 \pm 0,38	0,9886	0,302 \pm 0,001	0,96 \pm 0,05	0,9956	- 19,85
4b	10,68 \pm 0,46	0,9963	77,62 \pm 0,01	1,43 \pm 0,06	0,9975	- 33,60
4c	5,23 \pm 0,17	0,9958	0,038 \pm 0,001	0,71 \pm 0,04	0,9826	- 14,72

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota: ^a Os valores da energia livre de Gibbs foram calculados conforme a equação: $\Delta G = -RT \ln K_b$.

A redução da intensidade de fluorescência do ligante na presença de uma macromolécula é um indício de que ocorreu interação. Para tanto, é necessário que ocorra transferência de energia do ligante para o DNA, sendo este processo denominado de *quenching* e a relação quantitativa deste evento pode ser obtida empregando a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) (WU, et al., 2011). Com base na Tabela 1 foi observado que os valores de K_{SV} variaram de 1,94 a $56,5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, indicando que houve interação de todos os derivados β -carbolínicos avaliados com ctDNA.

Os valores das constantes de ligação (K_b) obtidos para os complexos formados com DNA variaram de $3,30 \times 10^2$ a $1,82 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$. De modo geral, os compostos com o radical *N,N*-dimetilnilina (radical **b**) apresentaram maiores valores das constantes de ligação ($39,8 - 182 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), o que pode estar relacionado com a presença de um substituinte nitrogenado ligado diretamente ao anel aromático, aumentando a polaridade da molécula e, sobretudo, possibilitando a presença de uma carga positiva, a partir da protonação do grupo $-N(CH_3)_2$ em função do valor de pH (7,40), no qual os experimentos foram conduzidos.

De acordo com a literatura, a presença de grupos positivos na estrutura da molécula, como grupo amino protonado (dependente do pH) ou nitrogênio quaternário (não dependente do pH), conduz a uma maior interação entre o ligante e o DNA. Este fato é reforçado em função de algumas moléculas como brometo de etídio, acridina orange, azul de metileno, tioflavina T e Hoechst 332585[®], apresentarem uma carga positiva e forte interação com DNA (NAFISI, et al., 2007; RAMARAJ; ILANCHELIAN, 2004; CHOI, et al., 2006).

Os compostos substituídos com radical fenil (radical **a**) apresentaram valores de K_b que variaram de 0,30 a $7,76 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, visto que estes possuem como radical R_2 apenas o anel aromático. Enquanto que para os compostos contendo o radical *o*-cloro fenil (radical **c**), de modo geral, os valores das constantes de ligação foram menores ($0,03 - 10,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) quando comparados aos outros substituintes (nomeadamente, **a** e **b**), fato que pode ser atribuído em parte ao impedimento estérico e à densidade eletrônica negativa do substituinte cloro do ligante adjacente, que diminui a afinidade ao DNA, pois os grupos fosfatos possuem densidade de carga negativa, podendo diminuir a interação desses compostos nos sulcos da biomolécula (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Assim, em termos gerais observou-se que os valores das constantes de ligação seguiram a seguinte ordem dentro de uma mesma série (sendo R_1 fixo) para substituição em R_2 quanto aos radicais: $b > a > c$. Destaca-se que os valores das constantes de ligação obtidos para os derivados β -carbolínicos e ctDNA corroboram com alguns trabalhos da literatura, como os estudos desenvolvidos por Sarkar e colaboradores (2014), Jia e colaboradores (2015)

e Sarkar e Bhadra (2014), que também avaliaram derivados β -carbolínicos e obtiveram valores das constantes na magnitude de 10^4 - 10^6 L mol⁻¹.

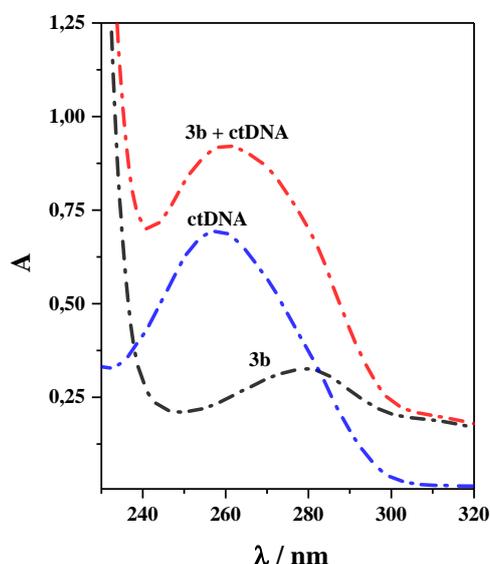
Por fim, com base na Tabela 1 pôde ser observado que, em geral, para todos os compostos avaliados o valor da proporção estequiométrica entre alcaloide β -carbolínico e ctDNA foi próximo a unidade, indicando proporção molar de 1:1. Os valores relativos do parâmetro termodinâmico para energia livre de Gibbs (ΔG) foram todos negativos, indicando que o processo de interação entre ctDNA e os compostos β -carbolínicos avaliados ocorre espontaneamente.

3.3.3 Estudos por UV-Vis: avaliação do mecanismo de *quenching*

Ao se realizar estudos por fluorescência molecular, é fundamental a avaliação do tipo de *quenching* dominante no processo de interação, o qual pode ocorrer de várias formas, com destaque para o *quenching* dinâmico (colisional) e estático (formação de complexo) em estudos de interação com DNA (LAKOWICZ, 2006).

A avaliação do tipo de *quenching* pode ser realizada a partir de estudo por UV-Vis através dos espectros de absorção do ctDNA, do composto livre e do complexo formado (Figura 2). Os valores de máxima absorção do composto **3b** e ctDNA estão localizados a 280 e 260 nm, respectivamente. Quando se adicionou ctDNA à solução dos compostos β -carbolínicos, ocorreu um aumento na absorvância, isto é, um efeito hipercrômico, o que indicou a interação da molécula com o ctDNA, corroborando com os resultados de fluorescência molecular.

Figura 2- Espectro de absorção do composto **3b** (10 μ M), ctDNA (100 μ M) e **3b**-ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.



Estas modificações podem ser observadas nos valores de absorvância da mistura **3b**-ctDNA ($A_{\text{complexo}} = 0,928$), e a soma dos valores das absorvâncias de **3b** e ctDNA ($A_{3b} + A_{\text{ctDNA}} = 1,015$). Este resultado é um indicativo de que o mecanismo de *quenching* foi estático, pois $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}) = -0,087$. Como os valores de ΔA foram diferentes de zero, indica que ocorreu alteração no estado fundamental em função da formação do complexo **3b**-ctDNA. Caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico, não seriam esperadas mudanças no espectro molecular de absorção no UV-Vis do complexo ($A_{\text{complexo}} = A_{3b} + A_{\text{ctDNA}}$), visto que o *quenching* dinâmico afeta somente o estado excitado, e não o estado fundamental (WU, et al., 2011). Comportamento similar foi observado para os demais compostos avaliados, como mostrado na Tabela 2 (SILVA, et al., 2016).

Tabela 2- Valores de absorvância para os compostos β -carbolínicos avaliados (10 μM), ctDNA (100 μM) e composto-ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.

Composto	A_{composto}	A_{ctDNA}	A_{complexo}	ΔA
1a	0,162	0,696	0,773	- 0,085
1b	0,185	0,695	0,862	- 0,018
1c	0,136	0,696	0,784	- 0,048
2a	0,045	0,695	0,786	+ 0,046
2b	0,109	0,695	0,858	+ 0,054
2c	0,059	0,695	0,792	+ 0,038
3a	0,229	0,695	0,896	- 0,028
3b	0,325	0,690	0,928	- 0,087
3c	0,298	0,695	1,004	+ 0,011
4a	0,132	0,698	0,980	+ 0,150
4b	0,068	0,705	0,775	- 0,018
4c	0,150	0,695	0,857	+ 0,012

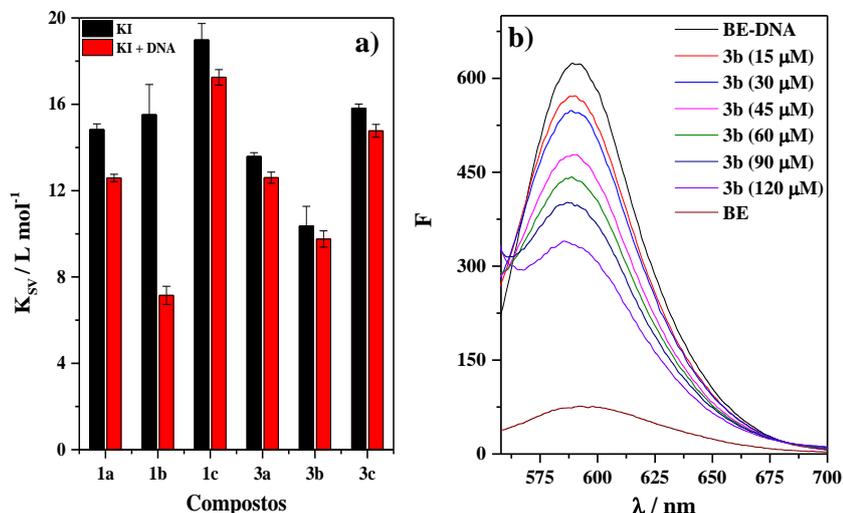
Fonte: elaborado pela autora, 2016.

3.3.4 Avaliação do modo de ligação composto-ctDNA

Os ensaios visando avaliar o modo de ligação com ctDNA foram realizados com os compostos contendo $R_1 = 1$ (classe contendo composto mais ativo, **1b**) e 3 (classe contendo composto com maior K_b , **3b**) de acordo com Esquema 2. Assim, o modo de ligação entre os derivados β -carbolínicos com ctDNA foi analisado avaliando o efeito de *quenching* do KI, competição com brometo de etídio e perfil espectral da desnaturação térmica (REHMAN, et al., 2015a; SARWAR, et al., 2015).

Para o ensaio do KI, as constantes de Stern-Volmer foram calculadas de acordo com a equação (3), onde $[Q]$ corresponde a concentração do *quencher*, no caso KI. A Figura 3 mostra os resultados para essa avaliação.

Figura 3- Avaliação do modo de ligação DNA-ligante. a) Valores de K_{SV} dos compostos β -carbolínicos (5,0 μM) por meio do quenching do KI na ausência e presença de ctDNA (50 μM). b) Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA por competição do composto 3b. Concentração do BE e ctDNA foram 2,0 e 6,0 μM , respectivamente. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) e $\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ a 30 $^{\circ}\text{C}$.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota-se a partir da Figura 3a que os valores de K_{SV} para duas classes de compostos β -carbolínicos avaliadas foram sistematicamente menores na presença de ctDNA. Esse perfil é um indício de que o modo de interação ocorre preferencialmente por intercalação, pois a molécula está protegida entre as bases do ctDNA, desta forma, não acessível ao íon iodeto. Assim, os valores de K_{SV} são menores na presença de ctDNA, pois existe uma quantidade menor do composto livre em solução. Caso os valores de K_{SV} na presença de ctDNA tivessem sido maiores, seria um indicativo que o iodeto teria acesso ao composto, e assim, o modo de ligação mais provável não seria por intercalação (SAVARIZ, et al., 2014; REHMAN, et al., 2015a).

Outro experimento para confirmar que os compostos avaliados realmente interagiam por intercalação consistiu no ensaio de competição com brometo de etídio. O brometo de etídio (BE) na forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, contudo quando o mesmo intercala com DNA, ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência, como pôde ser observado na Figura 3b.

Nos estudos realizados empregou-se um excesso de até 60 vezes dos compostos β -carbolínicos em relação à concentração inicial de brometo de etídio. Foi observado que a intensidade de emissão da BE-DNA diminuía à medida que a concentração dos compostos aumentava, obtendo-se reduções na faixa de 15,9 a 61,3% do sinal, como apresentado na Tabela 3. Nota-se que a ordem de magnitude quanto ao decréscimo do sinal está relacionada à

capacidade de deslocar o BE do DNA, obtendo-se em ambas as classes de compostos avaliados a seguinte ordem: $b > a > c$, seguindo a mesma tendência para os valores de K_b (Tabela 1). Desta forma, pôde-se concluir que o modo de ligação dos compostos avaliados ocorre de forma similar ao brometo de etídio, corroborando com os resultados da avaliação dos dados no ensaio com KI, e reforçando a proposta da interação dos compostos β -carbolínicos por intercalação (SILVA, et al., 2016).

Tabela 3- Parâmetros relativos ao deslocamento do brometo de etídio por ensaio de competição do complexo BE-DNA com compostos β -carbolínicos (120 μ M) avaliados (30 °C).

Compostos	BE-DNA
	Decréscimo do sinal de fluorescência, %
1a	25,7
1b	61,3
1c	15,9
3a	42,8
3b	46,2
3c	30,8

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

A dupla hélice do DNA é considerada estável devido às ligações de hidrogênio e interações entre as bases. A dupla hélice pode se dissociar em cadeias simples devido ao enfraquecimento das várias forças de ligação com o aumento da temperatura. A temperatura em que uma amostra de DNA está 50% na forma de fita simples e 50% na forma de fita dupla é denominada como temperatura de desnaturação (T_m) e está fortemente relacionada com a estabilidade da estrutura dupla hélice (LIU, et al., 2011). Por intercalação de pequenas moléculas no interior da dupla hélice de DNA, há um aumento na temperatura de desnaturação do DNA (T_m) acima de 5°C (SARWAR, et al., 2015; SHEN, et al., 2011). Esta maior variação positiva na temperatura de desnaturação é atribuída ao aumento da estabilidade da dupla hélice de DNA devido a intercalação de compostos entre as bases. No entanto, quando a molécula não interage por intercalação não é observado aumento acima de 5° C no valor de T_m .

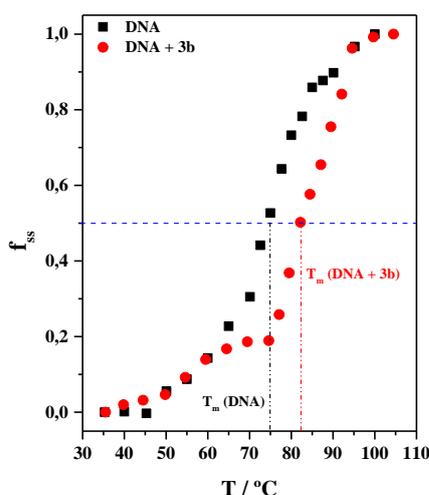
Adicionalmente, a ligação dos compostos em estudo com ctDNA foi avaliada através de ensaios relativos a temperatura de desnaturação do referido DNA. Assim, foi calculado o valor de T_m na ausência e na presença dos compostos avaliados e os valores de absorvância foram monitorados a 260 nm, numa faixa de 35-100°C. Para o cálculo do T_m empregou-se a equação 2:

$$f_{ss} = \frac{A - A_0}{A_f - A_0} \quad \text{Equação (2)}$$

onde f_{ss} , corresponde a fração de DNA como fita simples, A_f e A_0 representa os valores de absorvância máximo (DNA na forma de fita simples) e mínimo (DNA na forma de fita dupla) a 260 nm, respectivamente.

A temperatura de desnaturação de DNA (T_m) foi definida quando f_{ss} corresponde a 0,5. Representando graficamente f_{ss} versus a temperatura (mostrado na Figura 4), o valor de T_m pode ser obtido.

Figura 4- Curva de desnaturação térmica do ctDNA a 260 nm na ausência e na presença do composto. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl) a 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Assim, de acordo com a Figura 4 pôde-se observar que houve variação na temperatura de desnaturação do DNA em relação ao complexo formado, indicando que ocorreram mudanças na estabilidade da estrutura dupla hélice da biomolécula. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para os demais compostos avaliados.

Tabela 4- Resultados referentes ao estudo de desnaturação térmica do ctDNA frente aos compostos selecionados.

Compostos	ΔT_m , °C
1a	$7,7 \pm 0,7$
1b	$10,4 \pm 0,9$
1c	$7,5 \pm 0,5$
3a	$7,8 \pm 0,6$
3b	$8,4 \pm 0,5$
3c	$7,7 \pm 0,3$

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

De acordo com os resultados obtidos, na ausência dos alcaloides observou-se que o valor de T_m correspondeu a $74,9 \pm 1^\circ\text{C}$, no entanto na presença dos compostos avaliados, esse valor apresentou um ΔT_m de $7,5 \pm 0,5$ a $10,4 \pm 0,9$. Estes resultados indicam que o modo de

ligação dos compostos β -carbolínicos em estudo com o ctDNA se dá preponderantemente via intercalação ao DNA, confirmando os ensaios anteriores (SARWAR, et al., 2015; SHEN, et al., 2011).

3.3.5 Análise de correlação

Os compostos β -carbolínicos foram testados quanto à atividade antiproliferativa frente a sete linhagens de células tumorais humanas (SAVARIZ, et al., 2014), sendo estas: mama (MCF-7), ovário resistente (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29), próstata (PC-3) e melanoma (UACC-62). A partir dos valores de $\log K_b$ foi avaliado o grau de correlação através do coeficiente de determinação (r^2) e dos valores de IC_{50} ¹. Este ensaio visou observar se as variáveis independentes (K_b e IC_{50}) estão relacionadas e, desta forma, se o mecanismo de ação dos compostos avaliados pode ser associado à interação com DNA.

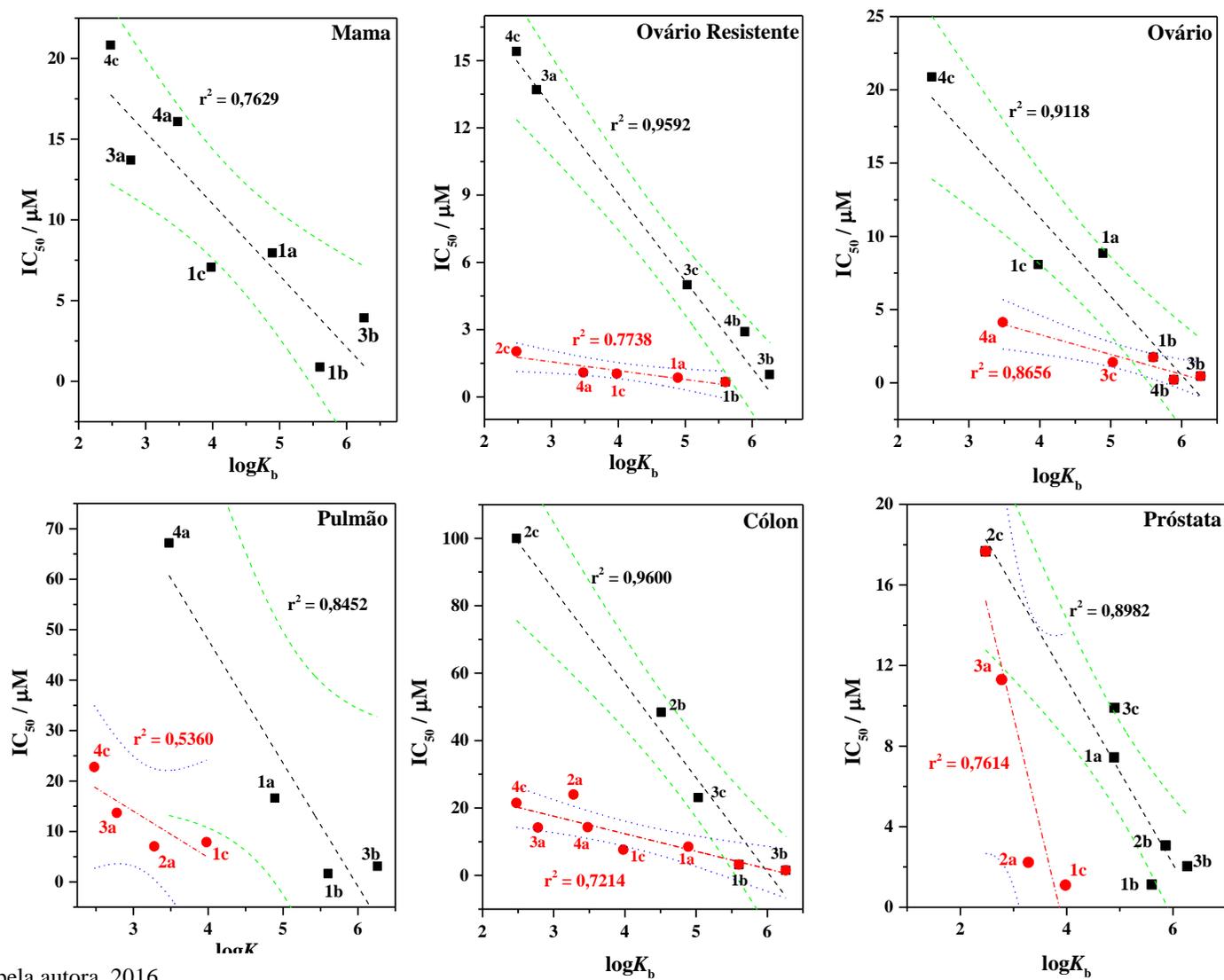
A Figura 5 apresenta os coeficientes de determinação obtidos para os compostos citados e todas as linhagens de células avaliadas, exceto melanoma (UACC-62). Para esta linhagem a correlação foi muito baixa, sendo $r^2 = 0,0974$, indicando que para este sistema a interação com DNA não deve ser o principal mecanismo de ação.

Neste estudo, consideraram-se apenas os compostos que se apresentaram contidos ou próximos ao intervalo de confiança estabelecido estatisticamente. Neste caso, foi empregado um nível de confiança de 95%. Assim, para a maioria das linhagens foram obtidas duas faixas de correlação frente aos compostos mais ativos.

De acordo com a Figura 5 foi possível relacionar as atividades antiproliferativas empregando no mínimo sete (mama, MCF-7) e no máximo onze compostos (cólon, HT29). Verificou-se de forma geral duas faixas de correlação onde r^2 variou de 0,5360 (pulmão, NCI-H460) a 0,9600 (cólon, HT29), com exceção para mama (MCF-7) onde se observou apenas uma faixa linear ($r^2 = 0,7629$). De acordo com os resultados, obteve-se uma tendência inversa, sendo que quanto maior o valor da constante de interação com ctDNA menor o valor de IC_{50} , e desta forma, mais ativos foram os compostos para aquela linhagem celular avaliada.

¹ Concentração mínima do fármaco capaz de produzir citotoxicidade de 50% da cultura celular (MENSAH, A. A., et al., 2014).

Figura 5- Gráfico de correlação linear do IC₅₀ (μM) vs logK_b a 95% de intervalo de confiança (linhas verdes e azuis).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Em relação aos compostos com os maiores valores de constante de ligação (K_b) merece destaque aqueles com radical R_2 igual ao grupo fenil *N,N*-dimetilanilina nomeadamente **1b** e **3b** que estiveram presentes em todas as correlações e também são os compostos mais ativos, seguidos de **4b** e **2b** (SAVARIZ, et al., 2014). Assim, é provável que o mecanismo de ação dos compostos β -carbolínicos avaliados esteja relacionado à interação com DNA. Contudo, pode-se inferir que os compostos **1b** e **3b** por estarem presentes na correlação para todas as linhagens (Figura 5) apresentam baixa seletividade quanto as linhagens celulares avaliadas. No entanto, os compostos **4b** e **2b** foram mais seletivos, visto apresentarem boa atividade somente para às linhagens celulares ovário resistente, ovário e próstata, respectivamente (SILVA, et al., 2016).

3.3.6 Estudos de *docking* molecular

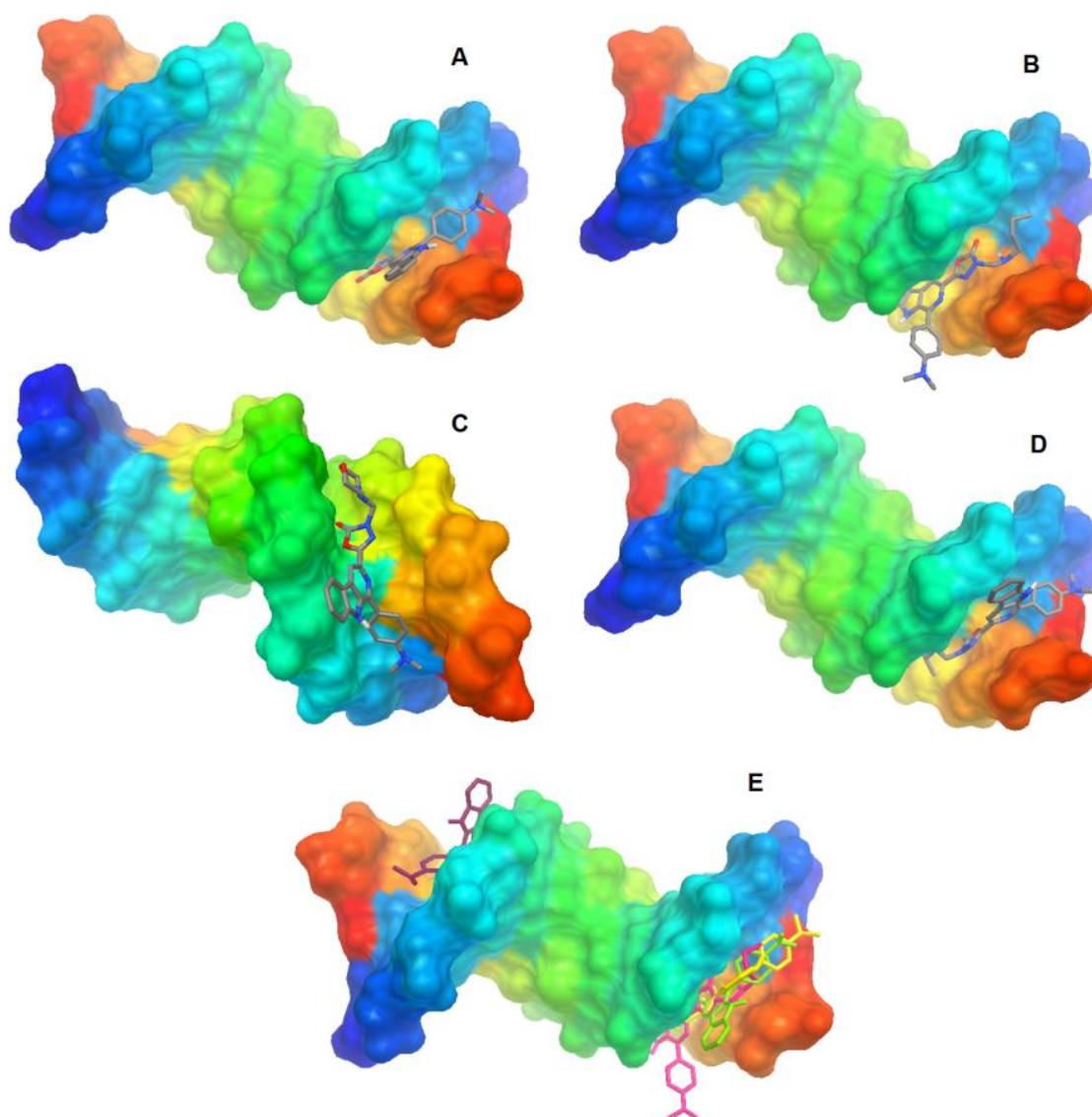
O *docking* molecular desempenha um papel importante no processo de interação entre pequenas moléculas e o alvo biológico, uma vez que fornece informações sobre o mecanismo de ligação e a formação de complexo energeticamente favorável, contribuindo na concepção de novos fármacos (REHMAN, et al., 2015b). Nesse sentido, estudos de docagem molecular foram realizados a fim de confirmar os resultados experimentais, prevendo o modo de ligação, bem como a energia de ligação relativa ao complexo formado entre as β -carbolinas e o ctDNA.

Para os estudos de *docking* molecular foram utilizados apenas os compostos mais ativos e conseqüentemente os que apresentaram maiores valores de K_b (1b, 2b, 3b e 4b), com o intuito de avaliar a coerência dos resultados obtidos experimentalmente através das técnicas espectroscópicas. Dessa forma, o radical R_2 foi mantido fixo e o R_1 foi variado nos alcaloides avaliados conforme o Esquema 2.

Nesses experimentos, inicialmente a estrutura de cada composto foi desenhada e submetida à otimização de energia, em seguida, foram importados para a estrutura do DNA para o processo de docagem. As conformações mais favoráveis dos derivados β -carbolínicos obtidas por *docking* foram analisadas. Os valores negativos das energias de ligação, -9,2 (**1b**); -8,6 (**2b**); -9,4 (**3b**) e -9,3 (**4b**) kcal mol⁻¹, indicaram um maior potencial de ligação dos compostos com o ctDNA através de interações não covalentes, sendo consistente com os estudos espectroscópicos. Para todos os compostos avaliados por *docking*, observaram-se algumas alterações conformacionais nas moléculas após a ligação, e uma preferência para a intercalação em *groove* menor pode ser vista (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados com outros derivados β -carbolínicos, onde o modo de intercalação em *groove*

menor foi preferido em relação à intercalação em *groove* maior e intercalação clássica (WU, et a., 2009). A Figura 6E indica que a substituição do grupo morfolil (**3b**) influencia a acomodação no interior da cavidade do ctDNA, visto que este composto pode interagir em uma região diferente no DNA em relação aos outros ligantes. Além disso, os derivados **1b**, **2b** e **4b** formaram ligações de hidrogênio envolvendo somente o anel 1,3,4-oxadiazol-3-ona.

Figura 6- Estruturas moleculares ancoradas dos derivados β -carbolínicos complexadas com o DNA. A: 1b; B: 2b; C: 3b; D: 4b; E: conjunto – 1b (verde); 2b (rosa), 3b (roxo), 4b (amarelo).



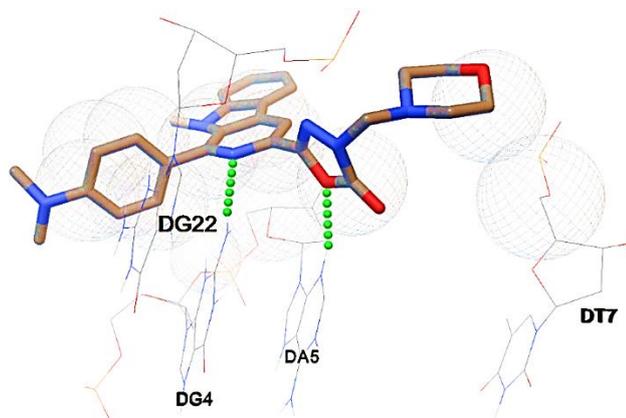
Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

Neste modelo, para o composto que exibiu melhor valor das energias de ligação (**3b**), os resíduos (bases) de DNA C21, C23, G22 e C3, A6, e T7 desempenharam um papel importante no sítio de ligação, resultando em contato próximo com a superfície da molécula através de interações hidrofóbicas. Além disso, o anel β -carbolínico é inserido entre os pares

de bases do DNA formando ligações de hidrogênio entre os anéis de piridina e o anel com resíduos de G4 e A5, respectivamente (Figura 7).

Dessa forma, estudos realizados por *docking* molecular foram consistentes com os resultados espectroscópicos, e, portanto, reforçam a proposta de que a interação dos derivados β -carbolínicos com o DNA deva ser o mecanismo preferencial de ação biológica destes compostos.

Figura 7- Docking molecular do composto 3b mostrando significativas ligações de hidrogênio (pontos verdes) e interações hidrofóbicas (esferas cinzas) com DNA.



Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

3.4 Conclusão

Os compostos avaliados neste estudo apresentaram interação significativa com o modelo de DNA empregado com formação de um complexo supramolecular não fluorescente, caracterizando o mecanismo de *quenching* estático.

As constantes de ligação (K_b) variaram de $3,30 \times 10^2$ a $1,82 \times 10^6$ L mol⁻¹. De modo geral, observou-se que os alcaloides com o radical *N,N*-dimetilnilina (radical *b*) apresentaram maiores valores de K_b ($3,98 \times 10^5$ – $1,82 \times 10^6$ L mol⁻¹), enquanto que para os compostos com o radical *o*-cloro fenil (radical *c*), os valores foram sistematicamente menores ($0,03$ – $10,7 \times 10^4$ L mol⁻¹). Os valores das constantes de ligação seguiram a seguinte ordem dentro de uma mesma série (sendo R_1 fixo) para substituição em R_2 quanto aos radicais: $b > a > c$.

De acordo com o ensaio com KI, competição com brometo de etídio e perfil da desnaturação do DNA em função da temperatura (T_m), foi possível inferir que os compostos avaliados interagem com o ctDNA preferencialmente via intercalação.

Uma vez estabelecido os valores de K_b foi possível estabelecer correlação linear com os valores de IC_{50} (μ M) para um intervalo de 95% de confiança frente a sete linhagens celulares. Nesta avaliação, foi possível observar tendência linear para a maioria dos alcaloides

avaliados obtendo-se valores de r^2 de 0,5360 (pulmão, NCI-H460) a 0,9600 (cólon, HT-29), com exceção para melanoma (UACC-62), onde a correlação foi baixa ($r^2 = 0,0974$), indicando que para este sistema a interação com DNA não deve ser o principal mecanismo de ação. Os compostos β -carbolínicos **1b** e **3b** por estarem presentes na correlação para todas as linhagens não apresentaram seletividade, já os compostos **4b** e **2b** foram seletivos, para as linhagens celulares ovário resistente (NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03) e próstata (PC-3), respectivamente.

Adicionalmente, através de estudos de *docking* molecular, observou-se que o composto **3b** apresentou menor valor de energia de ligação e que a interação com os resíduos C21, C23, G22 e C3, A6, e T7 do DNA desempenharam um papel importante no local de ligação. Além disso, esses resultados indicaram que a presença do grupo morfolil (em R_2) influencia na ancoragem de **3b** no interior da cavidade do DNA, enquanto os derivados **1b**, **2b** e **4b** formam ligações de hidrogênio envolvendo apenas o anel 1,3,4-oxadiazol-3-ona.

Por fim, a partir do conjunto de resultados obtidos de diferentes técnicas é possível sugerir que o mecanismo preponderante de ação dos compostos β -carbolínicos esteja diretamente relacionado à interação com DNA como principal alvo biológico.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, V.A., et al. Synthesis and antitumor activity of β -carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.19, p.6400–6408, Set., 2011.
- CAO, R., et al. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, China, v.338, p.1557–1563, Nov., 2005.
- CAO, R., et al. β -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. **Current Medicinal Chemistry**, China, v. 14, p.479-500, 2007.
- CHEN, Z., et al. Synthesis of novel β -carbolines with efficient DNA-binding capacity and potent cytotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, China, v.20, p.3876–3879, Mai., 2010a.
- CHEN, Z., et al. Synthesis, cytotoxic activities and DNA binding properties of β -carboline Derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v.45, p.4740-4745, Jul., 2010b.
- CHOI, Y.S., et al. Amine terminated G-6 PAMAM dendrimer and its interaction with DNA probed by Hoechst 33258. **Biophysical Chemistry**, República da Coréia, v.121, p.142–149, Fev., 2006.
- DEVEAU, A.M., et al. The Synthesis of Amino-Acid Functionalized β -Carbolines as Topoisomerase II Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos, v.11, p.1251–1255, Fev., 2001.
- DZIEGIELEWSKI, J., et al. Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, Polônia, v.63, p. 1653-1662, fev., 2002.
- FORMAGIO, A.S.N., et al. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.16, p.9660–9667, Out., 2008.
- FORMAGIO, A.S.N., et al. Synthesis and antiviral activity of β -carboline derivatives bearing a substituted carbohydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v.44, p.4695–4701, jul., 2009.
- GUAN, H., et al. Design of β -carboline derivatives as DNA-targeting antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v.41, p.1167–1179, Jun., 2006.
- HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of β -carboline alkaloids. **Food Chemistry**, Espanha, v.172, p. 640–649, Set., 2015.
- ILANCHELIAN, M., RAMARAJ, R. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 162, p.129–137, Jul., 2004.

- JIA, T., et al. Characterizations of cationic γ -carbolines binding with double-stranded DNA by spectroscopic methods and AFM imaging. **Organic & Biomolecular Chemistry**, China, v.13, p. 1234-1242, Nov., 2015.
- KHAN, F.A., et al. Recent pharmacological developments in β -carboline alkaloid "harmaline". **European Journal of Pharmacology**, Paquistão, v.721, p.391-394, Mai., 2013.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.
- LIU, L., et al. A class of novel AA-Trp-Trp-OBzl: synthesis, in vitro anti-proliferation, in vivo anti-tumor action, and intercalation mechanism. **Medicinal Chemistry Communication**, China, v. 2, p. 126-131, Nov., 2011
- MCKEEVER, C.; KAISER, M.; ROZAS, I. Aminoalkyl Derivatives of Guanidine Diaromatic Minor Groove Binders with Antiprotozoal Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Suíça, v.56, p.700-711, Jan., 2013.
- MENSAH, A. A., et al. Novel HDAC inhibitors exhibit pre-clinical efficacy in lymphoma models and point to the importance of *CDKN1A* expression levels in mediating their anti-tumor response. **Oncotarget**, Itália, v. 6, p. 5059-5071, Dez., 2014.
- NAFISI, S., et al. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, Iran, v.827, p.35-43, Jul., 2007.
- PATEL, K., et al. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine". **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Índia, v. 2, p.660-664, Ago., 2012.
- PEDROSO, R.B., et al. Beta-carboline-3-carboxamide derivatives as promising antileishmanial agents. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Brasil, v.105, p.549-557, Out., 2011.
- REHMAN, S.U., et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.566, p.7-14, Jan., 2015a.
- REHMAN, S.U., et al. Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.576, p.49-60, Mai., 2015b.
- RODRIGUEZ, F., et al. New Bis(2-aminoimidazoline) and Bisguanidine DNA Minor Groove Binders with Potent in Vivo Antitrypanosomal and Antiplasmodial Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 909-923, Out., 2008.
- SARKAR, S.; BHADRA, K. Binding of alkaloid harmalol to DNA: Photophysical and calorimetric approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v.130, p. 272-280, Dez., 2014.
- SARKAR, S.; PANDYA, P.; BHADRA, K. Sequence Specific Binding of Beta Carboline Alkaloid Harmalol with Deoxyribonucleotides: Binding Heterogeneity, Conformational, Thermodynamic and Cytotoxic Aspects. **PLoS ONE**, Índia, v.9, p. 1-14, Set., 2014.

SARWAR, T., et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v.73, p.9–16, Nov., 2015.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and Evaluation of New β -Carboline-3-(4-benzylidene)-4H-oxazol-5-one Derivatives as Antitumor Agents. **Molecules**, Brasil, v.17, p.6100-6113, Mai., 2012.

SHEN, H., et al. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, China, v.6, p.532–547, Mar., 2011.

SHI, J., et al. Characterization of interaction of calf thymus DNA with gefitinib: Spectroscopic methods and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v.147, p.47–55, Mar., 2015.

SILVA, M. M., et al. Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, In press, 2016.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v.124, p.1–19, Abr., 2013.

SRIDEVI, J.P., et al. Identification of potential Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I inhibitors: A study against active, dormant and resistant tuberculosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Índia, v. 72, p. 81-92, Mai., 2015.

TONIN, L.T.D., et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carboline)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Brasil, v. 64, p.386–389, Mar., 2010.

WEBB, M.R.; EBELER, S.E. A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v.321, p. 22–30, Jan., 2003.

WU, J., et al. Novel N-(3-carboxyl-9-benzyl- β -carboline-1-yl)ethylamino acids: Synthesis, anti-tumor evaluation, intercalating determination, 3D QSAR analysis and docking investigation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 44, p. 4153-4161, Out., 2009.

WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v.79, p.1202– 1209, Abr., 2011.

XIN, B., et al. Design, synthesis and biological evaluation of b-carboline derivatives as novel inhibitors targeting B-Raf kinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, China, v.22, p.4783–4786, Mai., 2012.

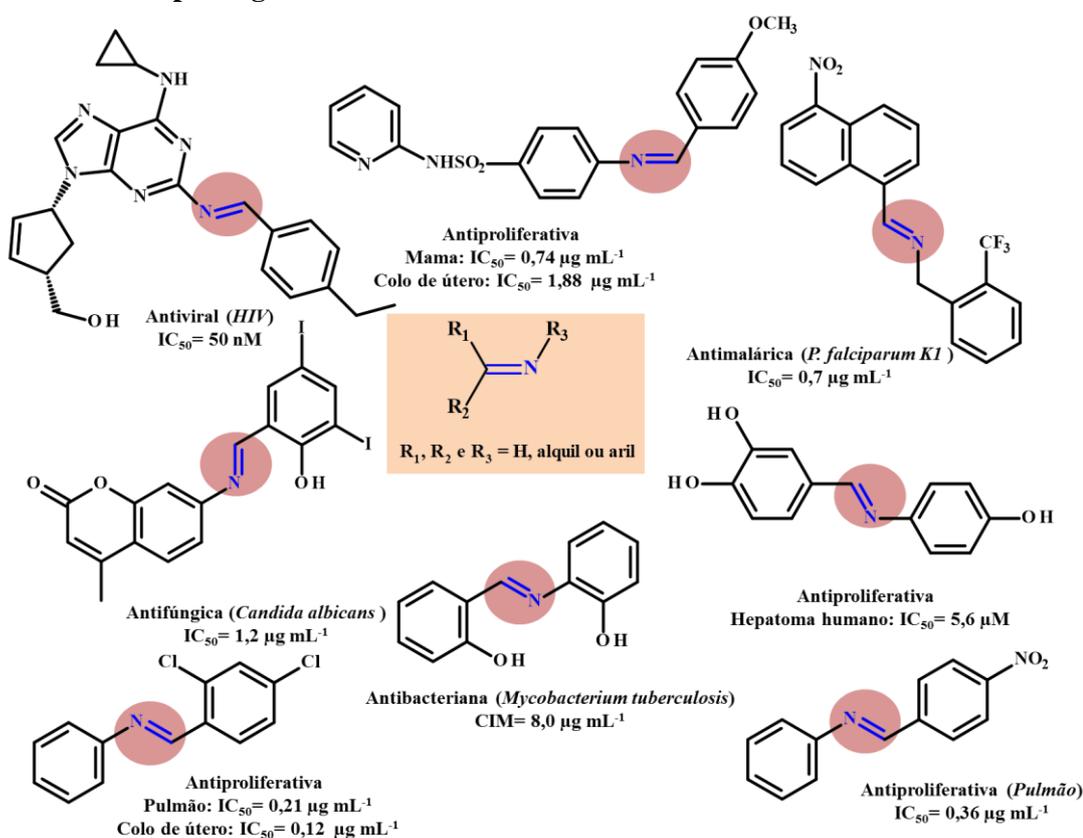
4 ARTIGO 2- ALDIMINAS

4.1 Introdução

Bases de Schiff também conhecidas como iminas ou azometinas, são compostos nitrogenados que apresentam estrutura análoga a de um aldeído ou cetona, sendo que o grupo carbonila é substituído por uma ligação dupla carbono-nitrogênio (grupo imina, representado em azul na Figura 1). Podem ser classificadas como aldiminas (derivadas de aldeídos) ou cetiminas (derivadas de cetonas) (SILVA, et al., 2011a; MAGALHÃES, et al., 2013).

As aldiminas são compostos que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antifúngica, antibacteriana, antimalárica, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiviral e antipirética (SILVA, et al., 2011a). Diversos compostos naturais e sintéticos biologicamente ativos possuem em sua estrutura o grupo funcional imina e sua presença tem importância fundamental para as atividades biológicas observadas (SILVA, 2013; SILVA, et al., 2011b). A Figura 1 apresenta uma compilação de alguns trabalhos destacando compostos que possuem em sua estrutura o grupamento imina, e que apresentam diferentes atividades biológicas (OZKAY, et al., 2008; KAMEL, et al., 2010; CHENG, et al., 2010; SILVA, et al., 2011a; SILVA, 2013).

Figura 1- Moléculas contendo grupo imina (em azul) que apresentam potente atividade biológica frente a diferentes patologias.

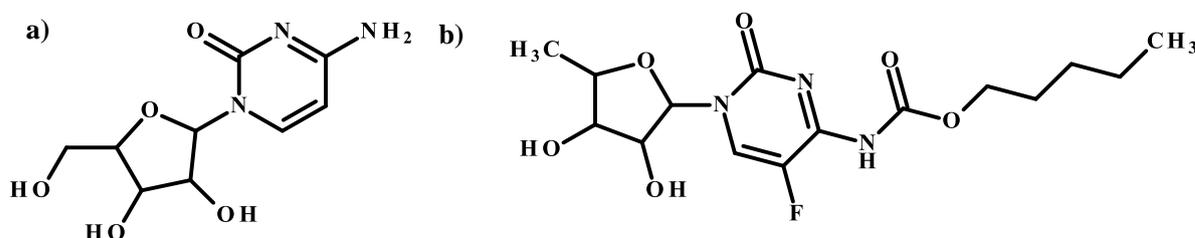


Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Na Figura 1, são apresentados parâmetros que expressam a magnitude da atividade desses compostos, como a concentração inibitória mínima (CIM), a qual indica a menor concentração capaz de inibir o crescimento da linhagem celular; e o IC_{50} que se refere à concentração do fármaco que causa a inibição de 50% do crescimento celular.

Devido a essas propriedades farmacológicas, as bases de Schiff têm se mostrado importantes candidatas a fármacos. Além disso, apresentam importantes propriedades químicas e biológicas tais como: a habilidade de se ligar reversivelmente ao oxigênio, promover reações redox em sistemas biológicos, clivar e oxidar o DNA, plasmídeos e proteínas, além de promover a apoptose (CRUZ, 2012). Nesse sentido, merecem destaque estudos de interação com o DNA, uma vez que este é o principal alvo intracelular de fármacos anticâncer, e essa interação com moléculas pequenas pode levar a danos ao DNA em células cancerosas ou inibir processos como divisão celular, resultando na morte celular (WANG, et al., 2006). Vale mencionar que muitos fármacos antineoplásicos utilizados na clínica médica atual possuem similaridade em sua estrutura química com as aldiminas, como exemplo, a Figura 2 que apresenta estruturas moleculares de fármacos comerciais antineoplásicos (CRUZ, 2012).

Figura 2- Fármacos antineoplásicos contendo similaridade com as aldiminas a) citarabina; b) capecitabina.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2012.

Apesar das diversas atividades farmacológicas dessas moléculas, estudos sobre a interação das bases de Schiff com ácidos nucleicos são limitados, visto que a maioria dos trabalhos tem como foco os derivados de complexos metálicos (HELAL, et al., 2012), devido à sua possível aplicação como novos agentes terapêuticos e suas propriedades fotoquímicas (WANG, et al., 2006; BALAKRISHNAN, et al., 2015; AJLOO, et al., 2015). Alguns desses complexos metálicos com bases de Schiff foram capazes de se ligar aos sulcos (VIJAYALAKSHMI, et al., 2000), intercalar nos pares de bases, enquanto outros causaram clivagem da cadeia do DNA (SILVEIRA, et al., 2008).

Assim, diante do limitado número de trabalhos sobre a interação das bases de Schiff com ácidos nucleicos, principalmente DNA, o principal objetivo desse capítulo é avaliar a interação de uma classe de aldiminas com o ctDNA, buscando determinar seu modo de interação e correlacionar parâmetros de ligação com os valores das atividades biológicas.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Explorar a técnica UV-Vis para avaliar a formação de complexo supramolecular;
- b) Empregar fluorescência molecular para avaliar a interação entre treze bases de Schiff e ctDNA (*Calf thymus*) em diferentes temperaturas, visando obter parâmetros como: constantes de ligação (K_b), estequiometria DNA-ligante (n) e dados termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG);
- c) Avaliar as principais forças envolvidas no processo de interação;
- d) Determinar o modo de ligação DNA-ligante, através de ensaios com o iodeto de potássio e estudos de competição com brometo de etídio;
- e) Correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com os valores de GI_{50} , buscando relacionar a interação com ctDNA e o mecanismo de ação da atividade antiproliferativa.

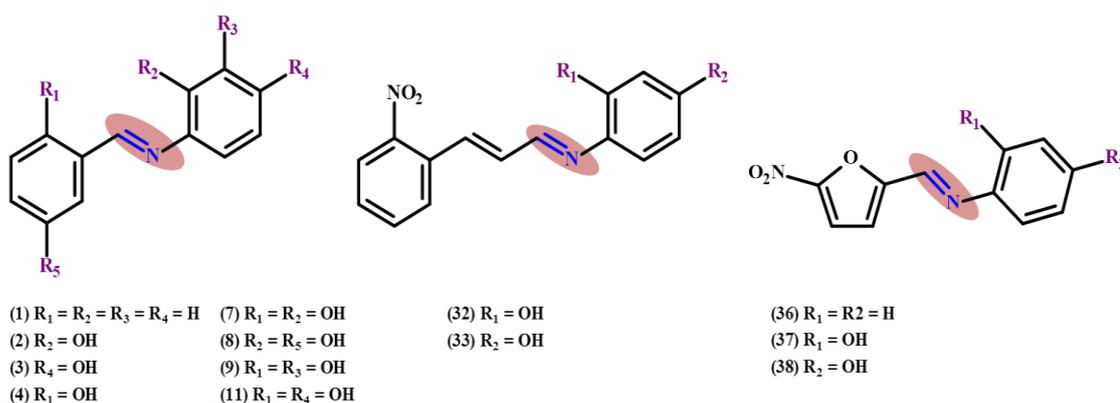
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Considerações iniciais

As estruturas das aldiminas avaliadas neste trabalho são apresentadas no Esquema 1, com destaque para o grupamento imina. A numeração dos compostos foi determinada pelo Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica (GEQOB) da Universidade Federal de Minas Gerais sob coordenação do professor Ângelo de Fátima. A descrição da síntese e caracterização estrutural destes compostos foram publicadas recentemente (SILVA, 2013).

As moléculas avaliadas nesse trabalho foram testadas quanto à atividade antiproliferativa frente a sete linhagens de células tumorais humanas, são elas: glioma (U251), mama (MCF-7), ovário resistente (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), e cólon (HT-29); além das células não cancerosas (VERO).

Esquema 1- Estrutura das bases de Schiff avaliadas.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

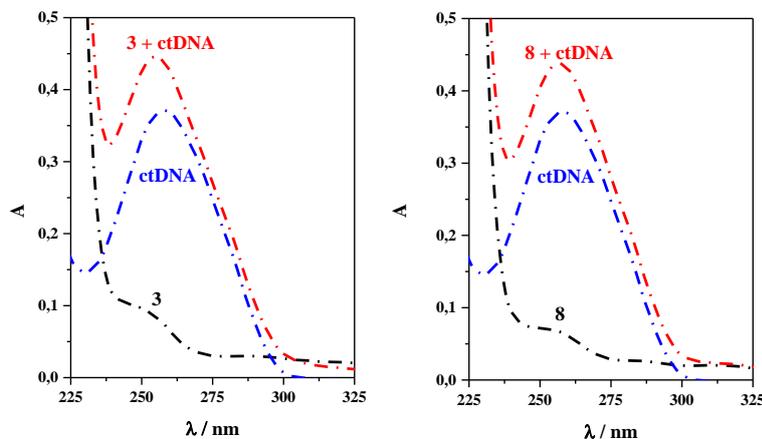
Dentre os compostos estudados, as bases de Schiff **3** e **8** (Esquema 1) foram as moléculas que apresentaram atividade citotóxica promissora frente às linhagens avaliadas. Assim, estes compostos foram empregados como modelo para apresentação dos resultados.

4.3.2 Estudos por UV-Vis: avaliação sobre formação de complexo DNA-ligante

Nos estudos empregando espectrometria na região do UV-Vis foi observado que ao adicionar ctDNA ao sistema, ocorreu aumento do sinal de absorvância e deslocamento para a esquerda (para menores comprimentos de onda), em relação a banda de absorção dos compostos (281 a 324 nm) para a banda de absorção relativa da macromolécula (~260 nm), caracterizando efeito hipercrômico e hipsocrômico, respectivamente.

Segundo Rehman e colaboradores (2015), tais resultados indicam qualitativamente que as bases de Schiff apresentam interação com o ácido nucleico. A Figura 3 apresenta os resultados das aldiminas **3** e **8** referentes a essa avaliação.

Figura 3- Espectro UV do ctDNA e das bases de Schiff 3 e 8 (10 μM) na ausência e na presença de ctDNA (60 μM).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Contudo, para avaliar se há formação de complexo supramolecular entre os ligantes avaliados e a macromolécula, é necessário que os valores das absorvâncias da mistura composto-ctDNA (A_{complexo}) sejam diferentes da soma dos valores das absorvâncias dos compostos e ctDNA isolados ($A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}$), ou seja, $A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}} \neq A_{\text{composto-ctDNA}}$ (WU, et al., 2011). Os resultados obtidos para todas as bases de Schiff avaliadas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores das absorvâncias das bases de Schiff avaliadas (10 μM), ctDNA (60 μM) e o complexo formado (composto-ctDNA) a 30 $^{\circ}\text{C}$.

Composto	λ , nm	A_{composto}	A_{ctDNA}	Comparação		ΔA^1
				$A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}$	$A_{\text{composto-ctDNA}}$	
1	257	0,115	0,634	0,749	0,708	- 0,041
2	258	0,114	0,629	0,743	0,706	- 0,037
3	258	0,074	0,371	0,445	0,439	- 0,006
4	258	0,082	0,633	0,715	0,693	- 0,022
7	261	0,096	0,378	0,474	0,456	- 0,018
8	258	0,062	0,370	0,432	0,435	+ 0,003
9	260	0,113	0,369	0,482	0,486	+ 0,004
11	260	0,083	0,366	0,449	0,494	+ 0,045
32	260	0,203	0,370	0,573	0,563	- 0,010
33	258	0,177	0,369	0,546	0,549	+ 0,003
36	264	0,061	0,357	0,418	0,434	+ 0,016
37	260	0,057	0,366	0,423	0,429	+ 0,006
38	263	0,099	0,383	0,482	0,421	- 0,061

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota: $^1\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}})$

De acordo com a Tabela 1, foi observada para todos os casos variação (positiva ou negativa) quanto ao somatório das absorvâncias e o valor para solução contendo os compostos avaliados e o ctDNA. Assim, pode-se concluir que foi formado complexo entre o ctDNA e as bases de Schiff avaliadas. Contudo, não foi possível, com este estudo preliminar, inferir sobre

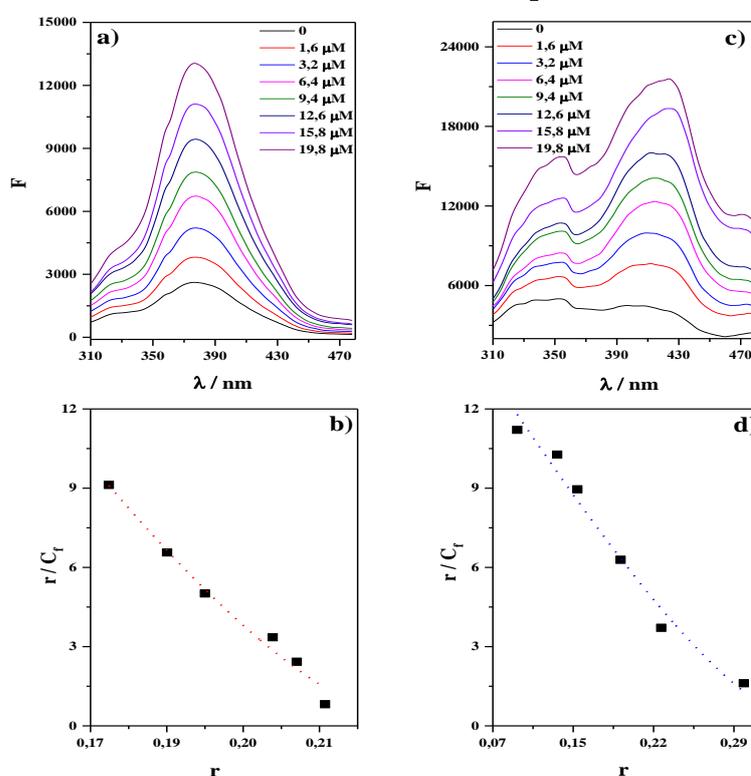
a intensidade da interação para cada composto em relação à interação com a macromolécula. Assim, para avaliar a magnitude dessa interação foram realizados estudos por fluorescência molecular.

4.3.3 Estudos por fluorescência molecular

Nos estudos empregando fluorescência molecular foi observado que todos os compostos avaliados apresentaram emissão na faixa de 390 a 420 nm quando excitados entre 265-300 nm. Verificou-se para todas as bases de Schiff avaliadas (**1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 32, 33, 36, 37 e 38**) uma baixa intensidade de emissão (concentrações na faixa de 1 a 10 μM). Apesar do grau de conjugação das moléculas, a reduzida intensidade de fluorescência observada pode ser justificada em função do menor grau de planaridade, considerando os aspectos estruturais das bases de Schiff avaliadas.

A adição de ctDNA às soluções contendo as bases de Schiff conduziu, em todos os casos, ao aumento da intensidade de fluorescência (Figura **4a e 4c**). Isto pode ser explicado considerando que a interação da base de Schiff com ctDNA leva à restrição no grau de rotação das moléculas, tornando-as mais planares (rígidas) e desta forma intensificando a emissão de fluorescência (HAN, et al., 2014).

Figura 4- Perfis espectrais das bases de Schiff a) **3** e b) **8**, respectivamente. Gráficos de Scatchard para as bases de Schiff c) **3** e d) **8** com ctDNA respectivamente.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Neste sentido, pode-se inferir pelo padrão estrutural das bases de Schiff avaliadas que o microambiente no qual estas moléculas interagem com o ctDNA apresenta uma menor polaridade, ou seja, é mais hidrofóbico em relação a condição original da molécula em meio aquoso. Desta maneira, este tipo de alteração também pode ser observado quando ocorre aumento da viscosidade do meio, assim, é possível que as duas condições (aumento da hidrofobicidade e viscosidade) estejam ocorrendo de forma simultânea com a adição de incrementos de ctDNA (LAKOWICZ, 2006).

A partir dos gráficos das Figuras **4a** e **4c** para as bases de Schiff **3** e **8**, observa-se o perfil espectral obtido, indicando intensificação da fluorescência em função da adição de quantidades crescentes de ctDNA. Comportamento similar foi observado para os demais compostos avaliados.

Para estabelecer as constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de interação, realizou-se uma titulação fluorimétrica e os dados obtidos foram analisados de acordo com a equação de Scatchard na forma não linear (STOJKOVIĆ, et al., 2015):

$$\frac{r}{C_f} = K_b(1-nr) \left\{ \frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right\}^{n-1} \quad \text{Equação (6)}$$

em que, r é o número de mols da base de Schiff por mol de ctDNA, C_f é a concentração livre da base de Schiff, K_b é a constante de ligação e n é o número de sítios de ligação. A concentração da base de Schiff na forma livre (C_f) foi calculada de acordo com a equação (13):

$$C_f = C_t \frac{(F/F_0 - P)}{(1 - P)} \quad \text{Equação (13)}$$

em que, C_t representa a concentração total da base de Schiff e F_0 e F corresponde a fluorescência na ausência e na presença de ctDNA, respectivamente. O valor de P foi determinado a partir do intercepto do gráfico F/F_0 vs $1/[ctDNA]$. Os ensaios foram realizados em três temperaturas (22, 30 e 38°C) para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos em função da variação de K_b .

A representação gráfica para a equação de Scatchard empregando os compostos **3** e **8** como modelo é apresentada na Figura **4b** e **4d**, respectivamente (38 °C). A Tabela 2 apresenta os dados de todos os compostos para esta avaliação.

Tabela 2- Parâmetros de ligação e termodinâmicos relativo à interação das bases de Schiff avaliadas com o ctDNA (38°C).

Base de Schiff	Estrutura	K_b (10^5 L mol^{-1})	n	Parâmetros Termodinâmicos		
				ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹)
1		0,37 ± 0,01	0,87	- 30,8	11,2	135,2
2		0,57 ± 0,04	1,17	- 31,4	3,62	112,7
3		2,87 ± 0,09	0,92	- 43,6	- 37,8	- 18,7
4		2,59 ± 0,01	0,79	- 34,4	- 5,77	91,9
7		1,96 ± 0,02	0,88	- 8,09	- 8,40	- 1,07
8		3,07 ± 0,07	1,02	- 57,5	- 44,6	- 41,4
9		1,70 ± 0,01	1,15	- 35,0	- 9,81	81,0
11		1,19 ± 0,03	0,73	- 8,09	- 8,36	- 0,82
32		1,40 ± 0,05	1,14	- 31,8	4,40	116,3
33		0,85 ± 0,01	1,00	- 29,1	15,4	143,2
36		0,77 ± 0,01	1,43	- 31,0	8,22	126,3
37		1,14 ± 0,01	1,41	- 31,6	3,72	113,6
38		0,65 ± 0,01	0,72	- 27,9	18,3	148,4

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

De acordo com a Tabela 2 pode ser observado que para todos os compostos avaliados o valor da proporção base de Schiff e ctDNA foi próximo a unidade, indicando relação estequiométrica de 1:1. Em relação aos valores das constantes, dividiu-se as bases de Schiff em duas séries: compostos hidroxilados e nitro-derivados. Assim, pode-se fazer as seguintes considerações para as bases de Schiff avaliadas:

a) bases de Schiff hidroxiladas:

- i)** a inserção de substituintes –OH na base de Schiff **1**, implica em aumento de K_b ;
- ii)** a presença de substituintes hidroxila nos anéis aromáticos, assim como o padrão de substituição, afetam significativamente tanto as propriedades biológicas (SILVA, 2013) quanto a interação com o DNA dessa classe de compostos, uma vez que para as bases de Schiff hidroxiladas **2**, **3**, **4**, **7**, **8**, **9** e **11** obteve-se uma maior constante de ligação em comparação a base de Schiff sem substituinte (**1**);
- iii)** comparando somente os derivados monohidroxilados **2**, **3** e **4** pode-se observar que a presença desses substituintes parece exercer maior influência quando localizados na posição *para* dos anéis aromáticos, visto que a base de Schiff **3** apresenta um valor de K_b maior que **2** e **4**;
- iv)** embora a presença de substituintes hidroxila seja importante, compostos com um elevado grau de hidroxilação apresentam uma diminuição de sua interação com o DNA, bem como de suas atividades biológicas (SILVA, 2013);
- v)** dentre as bases de Schiff di-hidroxiladas **7**, **8**, **9** e **11**, verificou-se que o composto **8** (-OH na posição *orto*) apresentou maior valor de constante em comparação com a aldimina **11** (-OH na posição *para*), evidenciando que a hidroxila na posição *para* nesses casos (di-hidroxilados) dificulta a interação com o DNA, sendo maiores as constantes quando a hidroxila encontra-se na posição *orto*, fato que pode ser explicado em parte, devido a possível formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular.

b) bases de Schiff nitro-derivados

- i)** comparando as bases de Schiff **32** e **33**, observou-se que a presença da hidroxila na posição *orto* conduziu ao aumento dos valores das constantes de interação com ctDNA, visto que a base de Schiff **32** apresentou valor de K_b cerca de duas vezes maior que a **33**;
- ii)** dentre as bases de Schiff **36**, **37** e **38**, verificou-se que a hidroxila na posição *orto* também levou ao aumento da interação com ctDNA, uma vez que a base de Schiff **37** apresentou valor de K_b maior que as aldiminas **36** e **38**.

De maneira geral, os valores das constantes de ligação foram maiores que os resultados encontrados por Arshad e colaboradores (2014), que obtiveram constantes na

magnitude 10^4 L mol^{-1} . Essa diferença entre os valores pode estar relacionada às condições experimentais utilizadas em ambos os trabalhos, tais como: tipo e concentração do tampão utilizado, força iônica, pH, concentração das aldiminas e DNA, faixa linear, tempo de incubação, tipo de DNA, entre outros, além das mudanças nas estruturas das bases de Schiff avaliadas.

4.3.3.1 Parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos (ΔH e ΔS) apresentados na Tabela 2 foram calculados de acordo com a linearização da equação (10) (equação de Van't Hoff) considerando que o calor da reação não se altera em função da temperatura. (SARWAR, et al., 2015):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (10)}$$

em que, K_b corresponde a constante de ligação, T a temperatura em Kelvin e R a constante dos gases ideais ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Enquanto que o valor da energia livre de Gibbs foi calculado pela equação (11):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (11)}$$

De acordo com Wang e colaboradores (2015), a partir dos parâmetros termodinâmicos é possível inferir a natureza das ligações envolvidas no processo de interação, bem como a descrição da espontaneidade deste processo. Assim, considerando o valor negativo de ΔG , percebeu-se que para todas as bases de Schiff avaliadas, o processo de interação foi termodinamicamente espontâneo.

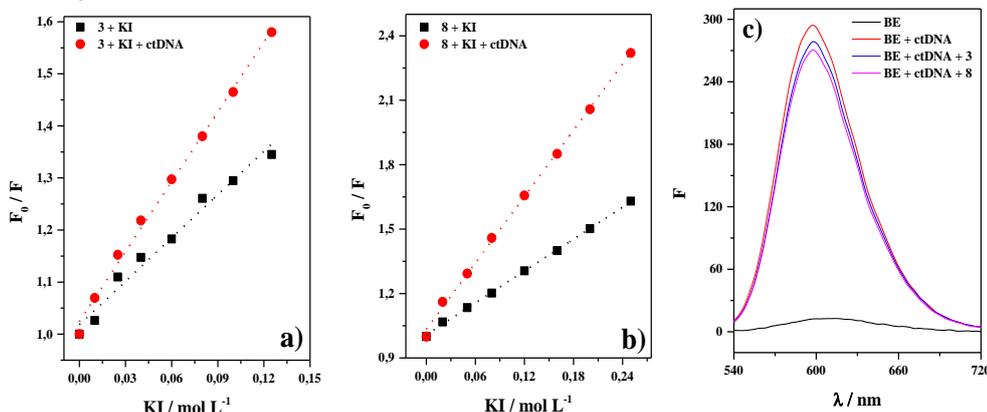
Sabe-se que a relação entre o tipo de força envolvida na interação e os valores de entalpia e entropia seguem a relação: $\Delta H^0 > 0$ e $\Delta S^0 > 0$: forças hidrofóbicas; $\Delta H^0 < 0$ e $\Delta S^0 > 0$: forças eletrostáticas e $\Delta H^0 < 0$ e $\Delta S^0 < 0$: ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (ZHANG, Y., et al, 2009). Desta forma, os compostos **1**, **2**, **32**, **33**, **36**, **37** e **38** interagem preferencialmente por forças hidrofóbicas, os compostos **4** e **9** por interação eletrostáticas, enquanto os compostos **3**, **7**, **8** e **11** por ligações de hidrogênio e forças de Van der Walls (SARWAR, et al., 2015).

4.3.4 Avaliação do modo de ligação

O modo de ligação das bases de Schiff com ctDNA foi proposto de acordo com duas estratégias: avaliação do efeito de *quenching* do KI e competição com brometo de etídio. Como mencionado no Capítulo 1, o íon iodeto é capaz de promover o *quenching* dinâmico de moléculas fluorescentes, mas para isso a molécula deve estar acessível para que ocorra a interação. Assim, compara-se o valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) na ausência e

presença de ctDNA (SAVARIZ, et al., 2014). As Figuras 5a e 5b mostram a representação gráfica das curvas de titulação dos compostos 3 e 8 na ausência e presença de ctDNA. A Tabela 3 apresenta os valores de K_{SV} para as aldiminas avaliadas.

Figura 5- Quenching das bases de Schiff. a) 3 e b) 8 (20 μ M) por meio do teste KI na ausência e na presença de ctDNA (13,3 μ M); c) Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema BE-ctDNA com adição das bases de Schiff 3 e 8.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

De acordo com a Tabela 3, nota-se que sistematicamente para todas as bases de Schiff avaliadas o valor de K_{SV} foi maior na presença de ctDNA, indicando que íon iodeto tem acesso ao composto, assim o modo de interação preferencial ocorre via *groove* (AHMAD, I.; AHMAD, M.,2015). Caso a molécula avaliada intercalasse, a mesma estaria protegida, e assim os valores de K_{SV} seriam menores na presença de ctDNA, visto que o íon iodeto não teria acesso ao ligante.

Tabela 3- Avaliação do modo de ligação das bases de Schiff com o ctDNA por efeito do quencher KI e equilíbrio de competição com o brometo de etídio (BE), a 38°C.

Base de Schiff	K_{SV} (L mol ⁻¹)				BE-ctDNA
	KI	r	KI + ctDNA	r	Decréscimo do sinal de fluorescência, %
1	1,71 ± 0,36	0,9934	3,43 ± 0,10	0,9988	21,2
2	3,53 ± 0,21	0,9856	5,32 ± 0,29	0,9981	25,5
3	2,77 ± 0,12	0,9890	4,47 ± 0,16	0,9979	5,42
4	5,11 ± 0,19	0,9968	10,80 ± 0,14	0,9888	13,8
8	2,46 ± 0,09	0,9997	5,15 ± 0,21	0,9993	11,3
7	5,73 ± 0,19	0,9841	9,94 ± 0,25	0,9906	10,2
9	5,94 ± 0,21	0,9912	10,32 ± 0,38	0,9910	8,03
11	5,73 ± 0,17	0,9831	11,14 ± 0,22	0,9806	7,25
32	3,58 ± 0,26	0,9900	8,04 ± 0,29	0,9847	14,3
33	6,03 ± 0,56	0,9811	6,83 ± 0,33	0,9959	10,4
36	4,38 ± 0,17	0,9986	5,76 ± 0,24	0,9992	3,77
37	1,53 ± 0,20	0,9990	5,99 ± 0,56	0,9875	6,83
38	5,31 ± 0,43	0,9954	8,35 ± 0,63	0,9909	11,3

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

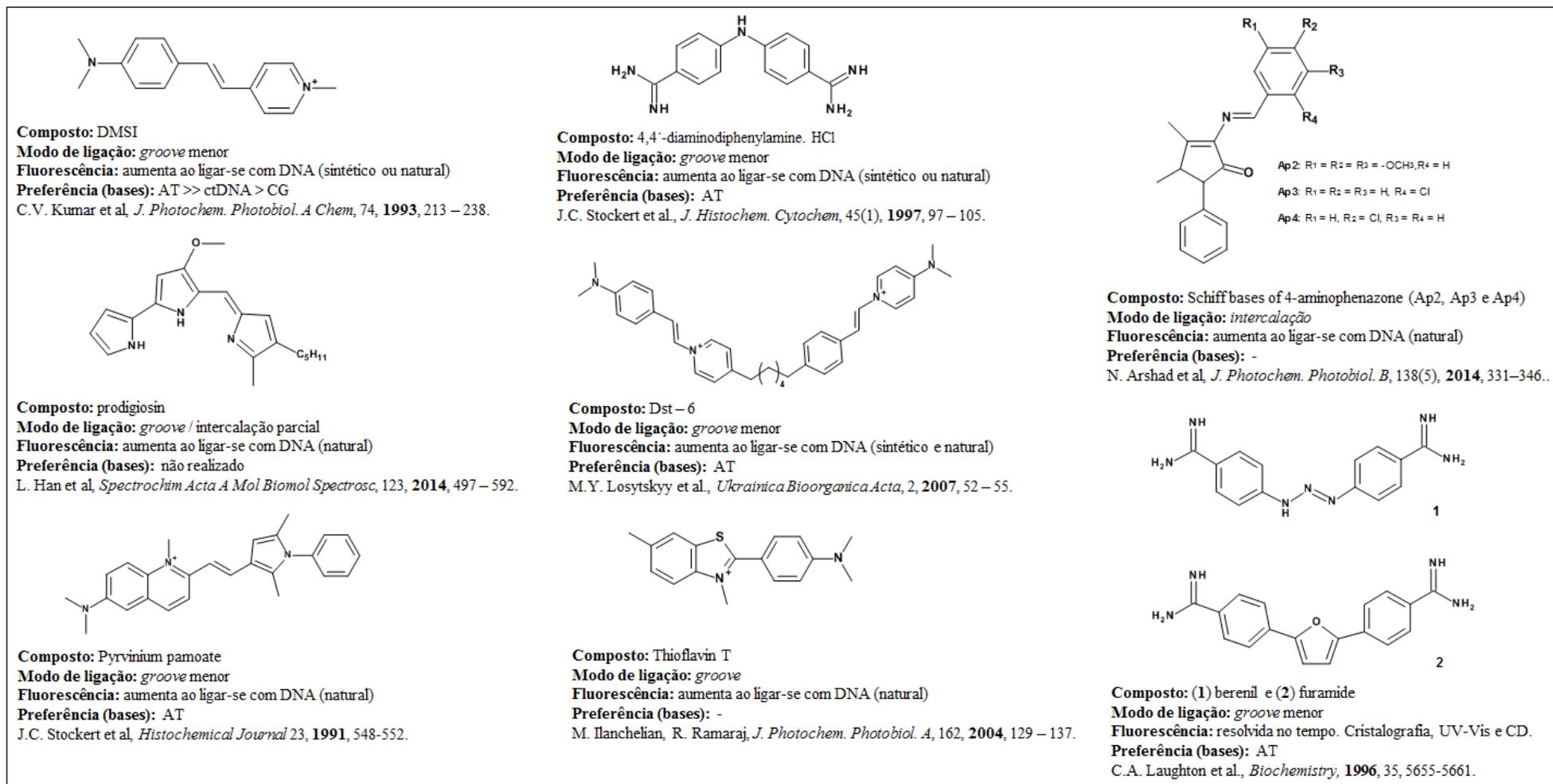
Para confirmar que as bases de Schiff avaliadas realmente não interagem por intercalação foi realizado um ensaio de competição com brometo de etídio. O brometo de etídio (BE) na forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, contudo quando o mesmo intercala com DNA, ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência, como pode ser observado na Figura 5c.

Nos estudos realizados empregou-se um excesso de 18 vezes das aldiminas em relação à quantidade de brometo de etídio inicial, obtendo-se reduções de 3,77 a 25,5% do sinal, como apresentado na Tabela 3. Estudos reportados na literatura têm mostrado que se a redução do sinal de fluorescência para o excesso empregado não chegar a 50% de redução do sinal (LING, et al. 2008), é um indicativo que a interação não ocorre de forma similar ao BE, no caso por intercalação. Estes resultados corroboram com a avaliação dos dados no ensaio com KI, reforçando a proposta por interação via *groove* das bases de Schiff avaliadas.

Os compostos que são tidos como intercalantes clássicos, citando: brometo de etídio, acridina orange, azul de metileno, quinacrina, ellipticina e doxorubicina apresentam estrutura (ou maior parte dela) planar e para maioria dos casos centros positivos, em função da presença de grupos amino. De forma semelhante, compostos que interagem por *groove* tem vários centros positivos (grupos aminos), contudo não apresentam uma elevada planaridade, podendo-se citar: DAPI, distamicina, netropsina, Hoechst 33342, berenil, entre outros (SHI, et al., 2006). De forma geral, a fluorescência destes compostos citados (intercalante e *groove*) aumenta conforme a concentração de DNA no meio.

Desta forma, o Esquema 2 apresenta uma relação de compostos com alguma similaridade com as bases de Schiff avaliadas. Nota-se que a maioria interage via *groove* menor com seletividade por DNA rico em Adenina-Timina (AT). Assim, para aumentar a seletividade das moléculas avaliadas seria interessante a inserção de grupos amino alquil substituídos, visando aumentar o grau de interação (K_b) e seletividade. Destaca-se aqui que o ctDNA não apresenta uma sequência de bases seletiva (a proporção é AT é similar a GC), para tal, deveria se empregar DNA sintético ou de algum organismo onde já se conhece a sequência dominante de interesse. Assim, estes derivados poderiam ser empregados com finalidades farmacêuticas ou analíticas (sondas para determinação e identificação de DNA).

Esquema 2- Relação de trabalhos com moléculas estruturalmente similares às bases de Schiff avaliadas e alguns dados em relação à interação com DNA.



4.3.5 Análise de correlação

As bases de Schiff foram testadas quanto à atividade antiproliferativa frente a sete linhagens de células tumorais humanas, sendo estas: glioma (U251), mama (MCF-7), ovário resistente (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), e cólon (HT-29). Além disso, esses compostos também foram testados frente a células não cancerosas (VERO) para avaliar sua seletividade quanto à inibição das células sadias e neoplásicas. O índice de seletividade que demonstra a atividade dos compostos frente às células neoplásicas em comparação com as células normais, foi calculado através da razão entre o GI_{50} ¹ das linhagens avaliadas em relação à linhagem VERO (SILVA, 2013).

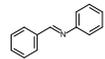
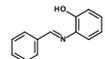
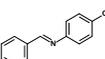
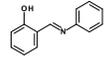
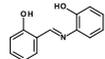
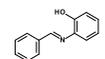
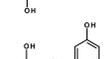
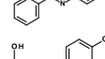
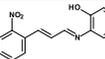
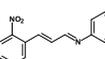
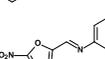
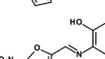
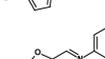
Para os ensaios biológicos, as aldiminas avaliadas foram divididas em duas classes e os experimentos realizados de forma independente. Devido a isso, são apresentados na tabela 4 dois valores para a doxorrubicina (fármaco de referência). Os resultados referentes a esses ensaios são mostrados na Tabela 4.

Nesta avaliação, buscou-se observar se as variáveis independentes ($\log K_b$ e GI_{50}) estão relacionadas e, desta forma, se o mecanismo de ação dos compostos avaliados está associado a interação com DNA.

Para tanto dividiu-se as bases de Schiff avaliadas em duas classes, sendo *classe 1*: compostos **2, 3, 4, 7, 8, 9 e 11** e *classe 2*: compostos **32, 33, 36, 37 e 38**. O critério utilizado para a definição das classes foi baseado na similaridade química dos compostos, classe 1 (sem grupo nitro, apenas um substituinte hidroxila) e classe 2 (com grupo nitro e o substituinte hidroxila).

¹ Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento (MENSAH, A. A., et al., 2014).

Tabela 4- Atividade citotóxica (GI_{50}^a , em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e índice de seletividade (IS^b ; dados entre parênteses) das bases de Schiff avaliadas frente a diferentes linhagens celulares; DOX^c representa a doxorubicina (fármaco de referência).

Bases de Schiff	Estrutura	Linhagens Celulares							
		U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	VERO
1		>250	16,4 (>15,2)	50,9 (>4,9)	>250	30,1 (>8,3)	>250	>250	>250
2		6,5 (18,8)	3,7 (33,1)	6,0 (20,4)	5,0 (24,5)	15,2 (8,1)	12,6 (9,7)	14,5 (8,4)	122,5
3		0,37 (13,8)	0,12 (42,5)	0,15 (34,0)	0,27 (18,9)	<0,25 (>20,4)	0,45 (11,3)	0,58 (8,8)	5,1
4		0,99 (25,3)	0,49 (51,0)	1,6 (15,6)	3,5 (7,1)	2,7 (9,3)	1,2 (20,8)	2,1 (11,9)	25,0
7		0,53 (30,9)	0,41 (40,0)	0,95 (17,3)	2,1 (7,8)	2,3 (7,1)	2,2 (7,5)	3,8 (4,3)	16,4
8		<0,25 (>95,2)	0,1 (238,0)	0,13 (183,1)	0,39 (61,0)	0,24 (99,2)	0,37 (64,3)	0,26 (91,5)	23,8
9		1,0 (33,9)	0,28 (121,1)	1,2 (28,3)	2,3 (14,7)	2,2 (15,4)	1,8 (18,8)	2,6 (13,0)	33,9
11		2,6 (7,7)	2,4 (8,3)	4,8 (4,1)	2,7 (7,4)	2,7 (7,4)	10 (2,0)	8,9 (2,2)	19,9
DOX^c		0,081 (2,0)	0,027 (5,9)	0,26 (0,6)	0,084 (1,9)	<0,025 (>6,4)	0,14 (1,1)	0,15 (1,1)	0,16
32		0,76 (11,1)	1,1 (7,6)	0,72 (11,7)	23,4 (0,4)	7,1 (1,2)	0,44 (19,1)	4,1 (2,0)	8,4
33		21,5 (1,3)	2,9 (9,8)	6,9 (4,1)	6,1 (4,7)	24,8 (1,1)	3,3 (8,6)	12,4 (2,3)	28,5
36		2,5 (2,2)	1,5 (3,6)	1,3 (4,2)	3,1 (1,7)	5,2 (1,0)	0,54 (10,0)	2,8 (1,9)	5,4
37		2,4 (1,2)	1,0 (2,8)	1,0 (2,8)	0,28 (10,0)	3,1 (0,9)	2,3 (1,2)	2,3 (1,2)	2,8
38		2,8 (1,3)	3,0 (1,2)	2,8 (1,3)	2,6 (1,4)	9,2 (0,4)	2,5 (1,4)	2,8 (1,3)	3,6
DOX^c		0,04 (25,0)	<0,025 (>40,0)	0,24 (4,2)	0,028 (35,7)	0,013 (76,9)	0,15 (6,7)	0,14 (7,1)	1,0

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

A base de Schiff **1** em virtude dos elevados valores de GI_{50} não foi considerada em nenhum grupo. Esta avaliação foi efetuada visando observar o grau de correlação linear entre dois conjuntos de variáveis independentes. A Tabela 5 apresenta os coeficientes de determinação obtidos para os compostos citados e todas as linhagens de células avaliadas.

Tabela 5- Correlação linear entre as constantes de ligação das bases de Schiff (38°C) com o ctDNA e atividade citotóxica (GI_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$), frente a diferentes linhagens celulares.

Linhagem Celular	Determinação (r^2) ^a	
	Classe 1 ^b	Classe 2 ^c
Glioma (U251)	- 0,8998	- 0,0079
Mama (MCF-7)	- 0,8881	+ 0,7557
Ovário resistente (NCI-ADR/RES)	- 0,8727	- 0,1994
Rim (786-0)	- 0,6524	+ 0,3473
Pulmão (NCI-H460)	- 0,8019	+ 0,6178
Próstata (PC-3)	- 0,8919	+ 0,0144
Cólon (HT-29)	- 0,9561	+ 0,2440
Não cancerosas (VERO)	- 0,7169	+ 0,6613

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota: ^aCorrelação linear (r) a 95% de confiança para relação IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $\text{alog}K_b$ (L mol^{-1}) + b

^bClasse 1: compostos 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 11 / ^cClasse 2: compostos 32, 33, 36, 37 e 38.

De acordo com a Tabela 5 percebeu-se que os coeficientes de determinação linear para os para os compostos da *classe 1* variaram de $-0,6524$ a $-0,9561$ indicando uma *tendência* inversa, ou seja, quanto maior o valor da constante de interação com ctDNA menor o valor de GI_{50} , e desta forma, mais ativos foram as bases de Schiff para aquelas linhagens celulares. De forma geral, destaca-se que a maioria dos valores do coeficiente de determinação foi próxima a unidade (valor máximo). Em função de uma tendência similar para os compostos da *classe 1* quanto aos valores de GI_{50} para as diferentes linhagens, não se pode inferir que exista alguma seletividade para um determinado tipo de célula e estas bases de Schiff.

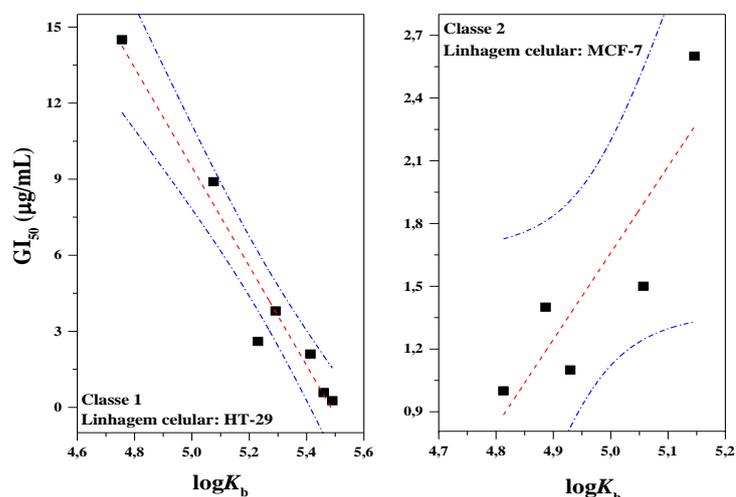
Para os compostos da *classe 2* observou-se majoritariamente tendência contrária, onde os valores do coeficiente de determinação variaram de $-0,1994$ a $+0,7557$ indicando que para maioria das linhagens avaliadas os valores de K_b e GI_{50} aumentam de forma proporcional, ou seja, quanto maior a interação com ctDNA maior a atividade dos compostos. Contudo, diferente da *classe 1*, as bases de Schiff da *classe 2* (principalmente 32) nesta avaliação foram seletivas para a linhagem de ovário resistente, mesmo com baixo valor de determinação ($-0,1994$).

Além disso, vale mencionar que tanto os compostos da classe 1 quanto da classe 2, apresentaram coeficientes de determinação de $-0,7169$ e $+ 0,6613$ para a linhagem de células não cancerosas, indicando que esses compostos têm potencial de inibir o crescimento tanto das células cancerosas quanto das células saudáveis. Entretanto, também foi possível observar que as bases de Schiff avaliadas apresentaram índices de seletividade (IS) mais elevados

quando comparados ao fármaco de referência (doxorrubicina) e de acordo com Ondo e colaboradores (2012) um $IS > 10$ é considerado interessante em testes *in vitro*. Assim, os compostos **3** e **8** são os mais promissores, uma vez que apresentaram tanto os maiores valores de atividade citotóxica contra as linhagens celulares avaliadas, quanto elevados valores de IS.

Por fim, a Figura 6 apresenta uma representação gráfica para as duas classes de bases de Schiff avaliadas, evidenciando o tipo de correlação existente para um intervalo de confiança de 95% para duas linhagens celulares selecionadas. Assim, como já mencionado, percebeu-se uma relação inversa entre os valores de K_b e GI_{50} para as bases de Schiff da *classe 1* (linhagem celular: cólon HT-29), e por outro lado, uma relação direta para as bases de Schiff da *classe 2* (linhagem celular: mama MCF-7).

Figura 6- Gráfico da correlação linear de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) vs $\log K_b$ a 95% de intervalo de confiança (linhas azuis).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

4.4 Conclusão

Os compostos avaliados neste trabalho apresentaram interação significativa com o modelo de DNA empregado, sendo verificada a formação de um complexo supramolecular com as bases de Schiff.

Assim, os valores de constantes de ligação variaram de $0,37$ a $3,07 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, sendo os compostos **3** e **8** os que apresentaram maiores valores de constantes de ligação e mostraram ser tão potentes quanto a doxorrubicina frente as células cancerosas de ovário resistente (NCI-ADR/RES), próstata (PC-3) e cólon (HT-29). Em geral, as bases de Schiff que apresentaram como substituintes grupos hidroxila mostraram ser mais ativas.

De acordo com o ensaio de competição empregando BE e do estudo com KI foi possível classificar o modo de ligação entre as bases de Schiff avaliadas e o ctDNA como *groove*. Na análise de correlação verificou-se que os compostos da *classe 1* apresentaram

coeficiente de determinação linear que variaram de $-0,6524$ a $-0,9561$ indicando uma *tendência* inversa em relação a K_b . No entanto, em função de uma tendência similar para os compostos dessa classe quanto aos valores de GI_{50} para as diferentes linhagens, não se pode inferir que exista alguma seletividade para um determinado tipo de célula e estas bases de Schiff.

Para os compostos da *classe 2* observou-se majoritariamente tendência contrária, onde os valores do coeficiente de determinação variaram de $-0,1994$ a $+0,7557$ indicando que para maioria das linhagens avaliadas os valores de K_b e GI_{50} aumentaram de forma proporcional. Contudo, diferente da *classe 1*, as bases de Schiff dessa classe, por esta avaliação, mostraram certa seletividade para a linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES), mesmo que com baixo valor de correlação ($-0,1994$).

Portanto, a partir do conjunto de resultados obtidos de diferentes técnicas é possível inferir que o mecanismo preferencial de ação das bases de Schiff avaliadas frente às diferentes linhagens de células esteja diretamente relacionado à interação com DNA como principal alvo biológico.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; AHMAD, M. Dacarbazine as a minor groove binder of DNA: Spectroscopic, biophysical and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 79, p.193–200, Mai., 2015.
- AJLOO, D., et al. Interaction of three new tetradentates Schiff bases containing N₂O₂ donor atoms with calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, Iran, v.77, p. 193–202, Marc., 2015.
- ARSHAD, N., et al. Spectroscopic, electrochemical DNA binding and in vivo anti-inflammatory studies on newly synthesized Schiff bases of 4-aminophenazone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v.138, p.331–346, Jul., 2014.
- BALAKRISHNAN, C., et al. Synthesis, spectroscopy, X-ray crystallography, DFT calculations, DNA binding and molecular docking of a propargyl arms containing Schiff base. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Índia, v.150, p.671–681, Jun., 2015.
- CHENG, L., et al. Antioxidant and antiproliferative activities of hydroxyl-substituted Schiff bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, China, v. 20, p.2417-2420, Mar., 2010.
- CRUZ, Wellington da Silva. **Síntese, caracterização e estudo teórico de bases de Schiff orto-substituídas e seus complexos de cobre(II) como potenciais agentes antitumorais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- HAN, L., et al. A multi-spectroscopic approach to investigate the interaction of prodigiosin with ct-DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.123, p.497–502, Dez., 2014.
- HELAL, M.H., et al. Diaminobenzene schiff base, a novel class of DNA minor groove binder. **International Journal Of Oncology**, Malásia, v. 41, p. 504-510, Dez., 2012.
- ILANCHELIAN, M., RAMARAJ, R. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 162, p.129–137, Jul., 2004.
- KAMEL, M.M., et al. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Egito, v.45, p.572-580, Nov., 2010.
- KUMAR, C.V., TURNER, R.S., ASUNCION, E.H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Estados Unidos, v. 74, p.231-238, Abr., 1993.
- LAUGHTON, C.A., et al. A Crystallographic and Spectroscopic Study of the Complex between d(CGCGAATTCGCG)₂ and 2,5-Bis(4-guanylphenyl)furan, an Analogue of Berenil. Structural Origins of Enhanced DNA-Binding Affinity. **Biochemistry**, Geórgia, v.35, p. 5655-5661, Fev., 1996.

- LING, X., et al. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v.93, p.172–176, Ago., 2008.
- LOSYTSKYY, M. Y., et al. To the studies on (*p*-dimethylaminostyryl)pyridinium based homodimer to dsDNA binding mechanism. **Ukrainica Bioorganica Acta**, Ucrânia, v. 2, p.52-55, 2007.
- MAGALHÃES, T.F.F., et al. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agentes, **Letters in Applied Microbiology**, Brasil, v.57,p.137-143, Abr., 2013.
- MENSAH, A. A., et al. Novel HDAC inhibitors exhibit pre-clinical efficacy in lymphoma models and point to the importance of *CDKN1A* expression levels in mediating their anti-tumor response. **Oncotarget**, Itália, v. 6, p. 5059-5071, Dez., 2014.
- ONDO, J. P., et al. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts and fractions of *Vitex madiensis*, medicinal plant of Gabon. **Tropical Medicine and International Health**, França, v. 17, p. 316-321, Mar., 2012.
- OZKAY, Y., et al. Antiproliferative effects of some N-benzylideneanilines, **Cell biochemistry and function**, Peru, v.26, p. 102-106, Abr., 2008.
- REHMAN, S.U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.576, p.49–60, Mai., 2015.
- SARWAR, T., et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 73, p.9–16, Nov., 2015.
- SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) b-carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.
- SHI, X., et al. Stability analysis for double-stranded DNA oligomers and their noncovalent complexes with drugs by laser spray. **Journal of Mass Spectrometry**, Japão, v. 41, p. 1086-1095, Mai., 2006.
- SILVA, C.M., et al. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, Brasil, v.2, p.1-8, Jun., 2011a.
- SILVA, C.M., et al. Synthesis of aryl aldimines and their activity against fungi of clinical interest, **Chemical Biology & Drug Design**, Brasil, v.78, p. 810-815, Jul., 2011b.
- SILVA, Cleiton Moreira. **Síntese de aldiminas e calix[4]aldiminas mediada por radiação de micro-ondas e avaliação de atividades antifúngica e citotóxica**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências-Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- SILVEIRA, V.C., et al. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Brasil, v.102, p. 1090–1103, Jan., 2008.

STOCKERT, J.C., et al. A New Fluorescence Reaction in DNA Cytochemistry: Microscopic and Spectroscopic Studies on the Aromatic Diamidino Compound M&B 938. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Espanha, v.45, p. 97–105, Ago., 1997.

STOCKERT, J.C., et al. DNA fluorescence induced pyrvinium binding by polymethine cation. **Histochemical Journal**, Espanha, v.23, p.548-552, Jun., 1991.

STOJKOVIĆ, M.R., et al. A short, rigid linker between pyrene and guanidiniocarbonyl-pyrrole induced a new set of spectroscopic responses to the ds-DNA secondary structure. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Croácia, v.13, p. 1629-1633, Dez., 2015.

Vijayalakshmi, R., et al. Interaction of DNA with $[\text{Cr}(\text{Schiff base})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{ClO}_4$. **Biochimica et Biophysica Acta**, Índia, v.1475, p.157-162, Abr., 2000.

WANG, B., et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding properties of the La(III) complex with Naringenin Schiff-base. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, China, v.14, p.1880-1888, Nov., 2006.

WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.136, p. 321–326, Out., 2015.

WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v. 79, p. 1202– 1209, Abr., 2011.

ZHANG, Y., et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 163, p. 1345–1352, Ago., 2009

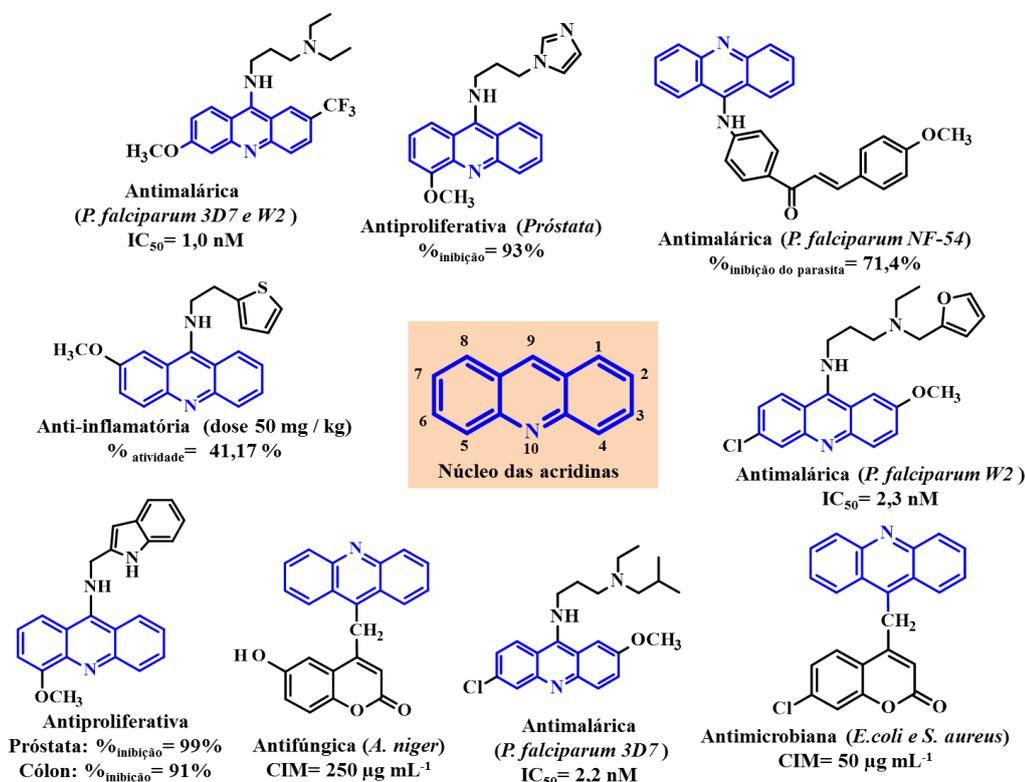
5 ARTIGO 3- ACRIDINAS

5.1 Introdução

Acridinas são alcaloides derivados dos antracenos, também conhecidas como dibenzo-piridina; 10-azaantraceno; 2,3-dibenzoquinolina, entre outros. São compostos heterocíclicos formados por dois anéis fundidos a um anel piridínico em posição central, como mostrado na Figura 1 (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012).

A substituição do anel heterocíclico faz com que os derivados produzidos possuam atividades biológicas diversas, tais como antitumoral, anticonvulsiva, antimalárica, anti-inflamatória e antimicrobiana (PATEL, M; MALI; PATEL, S., 2010; CHOLEWINSKI; DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2011; KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012). Devido a essas propriedades farmacológicas, desde o início do século XX as acridinas têm sido cada vez mais utilizadas (DENNY, 2002). A Figura 1 apresenta uma compilação de alguns trabalhos com derivados sintéticos de acridinas com diferentes atividades biológicas (TOMAR, et al., 2010; SHONDI, et al., 2010; PATEL, M; MALI; PATEL, S., 2010; ANDERSON, et al., 2006).

Figura 1- Acridinas que apresentam potente atividade biológica frente a diferentes patologias.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Na Figura 1 também são apresentados alguns parâmetros que indicam a magnitude da atividade desses compostos, como a concentração inibitória mínima (CIM), a qual indica a

menor concentração capaz de inibir o crescimento da linhagem celular; o IC_{50} que se refere à concentração do fármaco que promove uma inibição de 50% do crescimento celular; e o percentual tanto em termos de inibição de determinada linhagem celular ou parasita, quanto em ação frente à atividade anti-inflamatória.

Algumas dessas atividades biológicas se devem em parte a capacidade que as acridinas possuem de interagir com o DNA, uma vez que o mecanismo preferencial de algumas moléculas bioativas tem o DNA como principal alvo biológico. Segundo Giorgio e colaboradores (2011), já está bem estabelecido que a estrutura planar dos anéis tricíclicos é que confere a esses derivados a capacidade de interferir em uma grande variedade de processos metabólicos em células.

Nesse sentido, as acridinas e seus derivados foram o primeiro grupo de cromóforos amplamente utilizados para estudos da interação não covalente com o DNA (JOSEPH, et al., 2004). Devido a sua estrutura heteroaromática planar, o mecanismo de ligação dessas moléculas ocorre *via* intercalação, isto é, entre os pares de bases do ácido nucleico, resultando na desordem de algumas funções biológicas, levando ao combate de diversas doenças. (CHOLEWINSKI; DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2011).

Contudo, a ampla variedade de efeitos biológicos dos derivados acridínicos não está associada apenas a interação com o DNA, mas também com proteínas, especialmente algumas enzimas-chaves na proliferação celular, como as topoisomerases (BELMONT et al., 2007; JANOCKOVÁ et al., 2015). A ligação ao DNA conduz a formação de um complexo acridina-DNA-enzima, o qual bloqueia a ação das topoisomerases levando à inibição de processos celulares críticos, como a replicação e transcrição do DNA, resultando em morte celular (POMMIER, 2009).

Assim, em virtude das propriedades demonstradas por essa classe de moléculas, estas têm sido consideradas importantes candidatas a fármacos, e amplamente exploradas em diversas aplicações terapêuticas, principalmente, por possuir potentes atividades antimaláricas (AUPARAKKITANON, et al., 2003; CHAVALITSHIEWINKOON-PETMITR, et al., 2001; GAMAGE, et al., 1994; ANDERSON, et al., 2006). Vale mencionar que um dos obstáculos enfrentados para o controle da malária é a resistência aos medicamentos, assim é de suma importância o desenvolvimento de novas formulações mais eficazes e seletivas para o controle dessa doença (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001).

Dessa forma, a versatilidade do núcleo acridínico impulsiona pesquisas para o desenvolvimento de moléculas alvo, estruturalmente mais eficazes e seguras para o controle de diversas patologias, em particular, a malária. Assim, o objetivo principal desse capítulo é

avaliar de forma quantitativa e qualitativa a interação de derivados de acridinas, buscando determinar seu modo de interação e correlacionar parâmetros de ligação (K_b) /energia de afinidade com os valores das atividades biológicas, no intuito de inferir sobre o mecanismo de ação dessas moléculas em relação à atividade antimalárica.

5.2 Objetivos Específicos

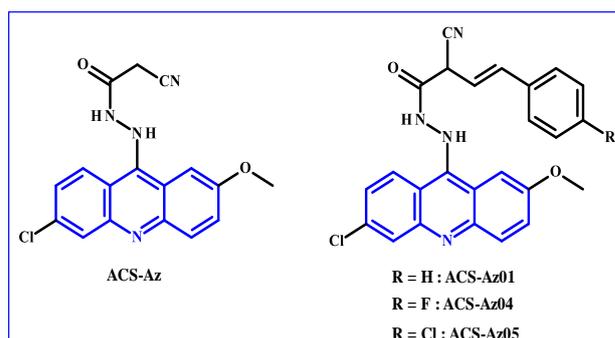
- a) Avaliar a interação entre quatro derivados de acridinas e ctDNA (*Calf thymus*), e obter parâmetros como: constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constantes de ligação (K_b), estequiometria DNA-ligante (n) e energia livre de Gibbs (ΔG) através de técnicas de fluorescência molecular;
- b) Avaliar o mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação através da técnica UV-Vis;
- c) Determinar o modo de ligação DNA-ligante através de ensaios com o iodeto de potássio e estudos de competição com brometo de etídio;
- d) Confirmar o modo de ligação DNA-ligante através de estudos de transferência de energia;
- e) Avaliar os resultados experimentais, prevendo o modo de ligação, bem como a energia de ligação relativa ao complexo formado entre os derivados de acridina e ctDNA através de experimentos de *docking* molecular;
- f) Correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com os valores de IC_{50} e energia de afinidade, buscando relacionar a interação com ctDNA e o mecanismo de ação da atividade antimalárica.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Considerações iniciais

As estruturas das acridinas avaliadas estão apresentadas no Esquema 1, a síntese e caracterização dessas moléculas, bem como os ensaios biológicos foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Esquema 1- Estruturas das acridinas avaliadas.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Dentre os compostos avaliados o **ACS-Az01** (Esquema 1) foi o que apresentou a maior constante de interação com ctDNA bem como a melhor atividade biológica, assim este composto foi empregado como modelo para apresentação dos resultados.

5.3.2 Avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular

Na avaliação da interação dos derivados de acridinas com o ctDNA, foi observado que todos os compostos avaliados apresentam emissão em 461 nm quando excitados entre 280-295 nm. Dessa forma, em virtude da capacidade de fluorescer, as acridinas foram tituladas, onde se verificou que ao adicionar quantidades crescentes de ctDNA ao sistema, ocorreu uma diminuição gradual da fluorescência dos compostos, em função da redução da concentração livre dos mesmos. A Figura 1a apresenta o perfil espectral obtido para o composto **ACS-Az01**, comportamento similar foi observado para os demais compostos avaliados.

Através dos resultados da titulação espectrofluorimétrica foi possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de ligação (K_b) e estabelecer o número de sítios de ligação entre os ligantes e o ctDNA. Dessa forma, para determinar o valor da constante de Stern-Volmer, empregou-se a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Equação (3)}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de ctDNA, respectivamente. $[Q]$ é a concentração de ctDNA (que atua como *quencher*) e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer.

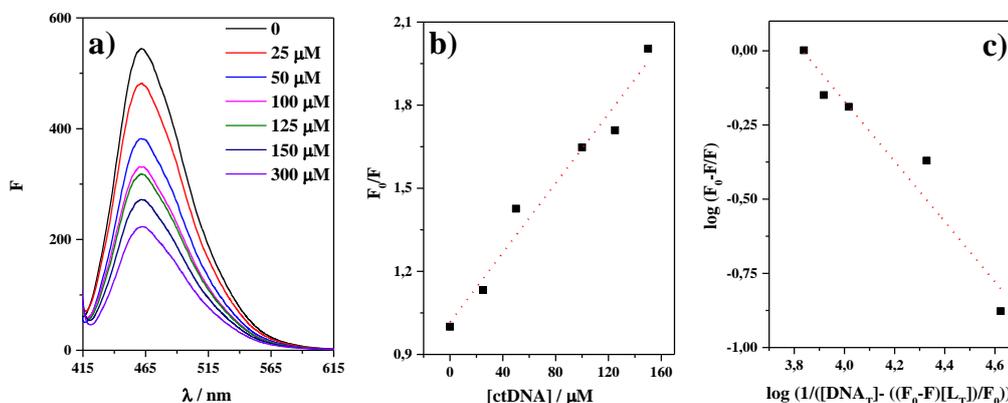
A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) do complexo supramolecular formado entre as moléculas avaliadas e ctDNA foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b + n \log \left(\frac{1}{[\text{DNA}]_T - \frac{F_0 - F \cdot [L]_T}{F_0}} \right) \quad \text{Equação (7)}$$

onde, $[L]_T$ é a concentração total do ligante. Os valores de K_b e n são obtidos a partir da curva de $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log(1/([\text{DNA}]_T - ((F_0 - F) [L]_T)/F_0))$.

As Figuras 2b e 2c apresentam os perfis das curvas para o composto ACS-Az01 a partir da linearização das equações (3) e (7), respectivamente. A Tabela 1 apresenta os dados de todos os compostos para esta avaliação.

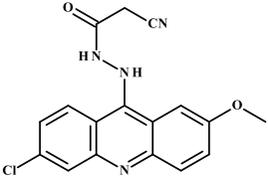
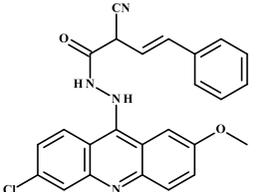
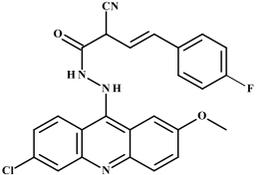
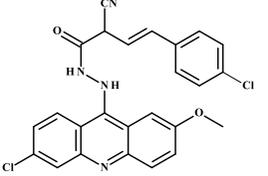
Figura 2- Resultados obtidos para a avaliação da interação DNA-ligante. a) Perfil espectral do composto ACS-Az01 (10 μM) com adição de incrementos crescentes de ctDNA; b) Gráfico de Stern-Volmer para o composto ACS-Az01 (processo de quenching); c) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto Az01 com o ctDNA. Condição: pH = 7,4 (tampão fosfato) a 25 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Como já descrito anteriormente, as mudanças espectrais indicam de forma qualitativa a interação entre os compostos avaliados e o ctDNA. Porém é indispensável que o ligante transfira energia para a biomolécula, sendo esse processo denominado de *quenching*, representado pela equação de Stern-Volmer.

Tabela 1- Parâmetros de interação do ctDNA com os derivados de acridinas a 30 °C.

Compostos	Estruturas	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			Parâmetros termodinâmicos
		$K_{SV} (10^3 \text{ L mol}^{-1})$	r	$K_b (10^3 \text{ L mol}^{-1})$	n	r	$\Delta G^0 (\text{kJ mol}^{-1})^a$
ACS-Az		$3,79 \pm 0,42$	0,9821	$4,17 \pm 0,82$	$0,99 \pm 0,18$	0,9690	-20,6
ACS-Az01		$6,27 \pm 0,56$	0,9846	$7,76 \pm 0,61$	$1,01 \pm 0,15$	0,9702	-22,2
ACS-Az04		$1,65 \pm 0,20$	0,9786	$2,09 \pm 0,69$	$1,02 \pm 0,16$	0,9750	-18,9
ACS-Az05		$4,00 \pm 0,48$	0,9844	$4,47 \pm 0,71$	$0,98 \pm 0,16$	0,9729	-20,8

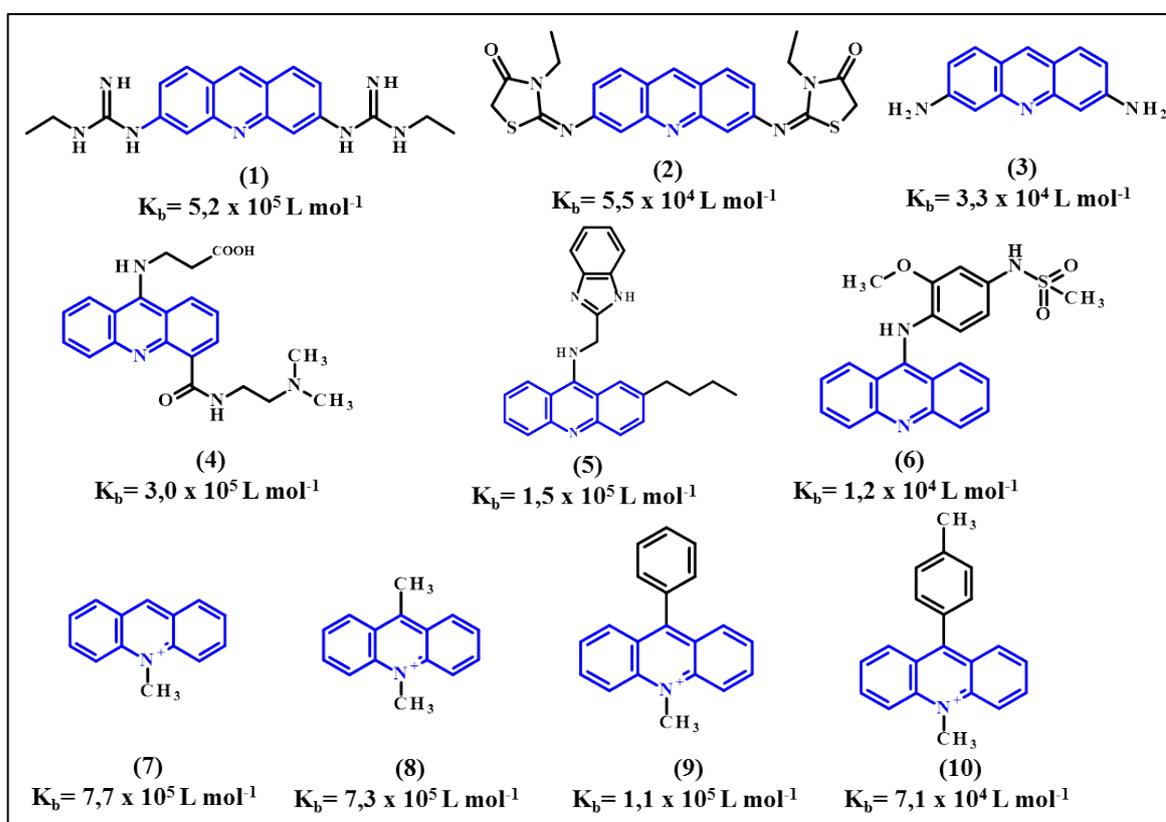
Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota: ^aOs valores da energia livre de Gibbs foram calculados conforme a equação: $\Delta G = -RT \ln K_b$.

Assim, de acordo com a Tabela 1, foi observado que os valores de K_{SV} variaram de 1,65 a $6,27 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, indicando que houve interação de todas as acridinas avaliadas com o ctDNA.

Os valores de K_b obtidos variaram de 2,09 a $7,76 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Esses valores foram menores que os resultados encontrados na literatura para outras acridinas que obtiveram constantes na magnitude $10^4 - 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, como mostrado na Figura 3 (GAO, et al., 2015; WU, et al., 2008; KWON, et al., 2013; PLSIKOVA, et al., 2012; JANOVEC, et al., 2007; JOSEPH, et al., 2004; JANGIR, et al., 2012).

Figura 3 - Derivados de acridinas e suas respectivas constantes de ligação com o DNA.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Essas diferenças entre os valores das constantes podem estar relacionadas com diversos fatores referentes às condições experimentais utilizadas, tais como: tipo e concentração do tampão utilizado, força iônica, pH, concentração das acridinas e DNA, faixa linear, tempo de incubação, tipo de DNA, entre outros. Além disso, devem-se considerar as características de cada técnica empregada para fazer a medida dos valores das constantes entre o ligante e o DNA. O padrão de substituição mostrou-se um fator crítico, uma vez que as acridinas estudadas nesse trabalho são substituídas em C9, enquanto em outros estudos, a substituição ocorre com mais frequência nos C3 e C6 (Figura. 3, compostos 1-3).

De acordo com a Figura 3, percebeu-se que a presença de substituintes nitrogenados facilita o processo de interação, pois dependendo do pH do meio no qual os experimentos foram conduzidos, esses substituintes são passíveis de serem protonados (Figura 3, compostos **1-6**) gerando uma carga positiva. Ao avaliar as moléculas **7-10** nota-se que os valores de K_b são da ordem de 10^5 devido à presença de um nitrogênio quaternário que possibilita interação eletrostática desses compostos com o DNA, entretanto o aumento do volume do substituinte ligado diretamente a C9 diminui a interação, pois dificulta a aproximação do núcleo acridina ao DNA (BARRA; NETTO, 2015). Este fator justifica os menores valores de K_b para os compostos avaliados em função da substituição em C9 com grupos volumosos (Figura 3, compostos **9 e 10**).

Para as acridinas estudadas neste trabalho, as constantes de ligação seguiram a seguinte ordem (ACS): Az01 > Az05 > Az > Az04, sendo essa sequência melhor explicada a partir das energias de afinidade obtidas pelos ensaios de *docking* molecular.

Por fim, com base na Tabela 1 pôde ser observado que, em geral, para todos os compostos avaliados o valor da proporção estequiométrica entre acridinas e ctDNA foi próximo a unidade, indicando proporção molar de 1:1. Os valores relativos ao parâmetro termodinâmico para energia livre de Gibbs (ΔG) foram todos negativos, indicando que o processo de interação ocorre espontaneamente.

5.3.3 Estudos por UV-Vis: avaliação do mecanismo de *quenching*

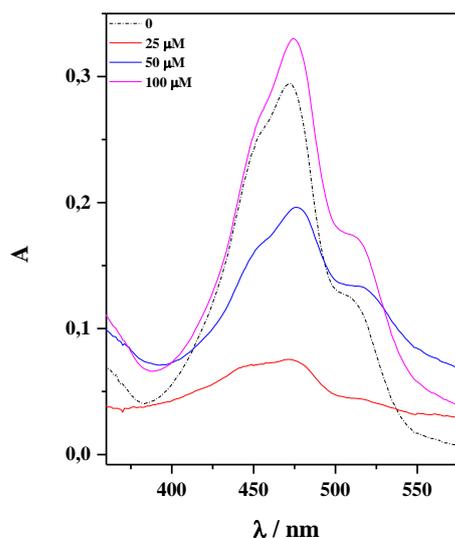
A partir do ensaio por UV-Vis, é possível avaliar o tipo de *quenching* dominante no processo. Assim, se analisa os espectros de absorção do ctDNA, do composto livre e do complexo formado, porém como os compostos apresentam máxima absorção numa região na qual o DNA não absorve, este não foi mostrado na Figura 4.

Os valores de máxima absorção do composto **ACS-Az01** e ctDNA estão localizados em 472 e 260 nm, respectivamente. Ao se adicionar ctDNA à solução, ocorreram mudanças espectrais indicando interação desse composto com ctDNA, corroborando com os resultados de fluorescência molecular (Tabela 2).

Conforme relatado por Chi e colaboradores (2010), um efeito hipocrômico e deslocamento para o azul do espectro de absorção são sinais de ligação externa (*groove*), enquanto um desvio para o vermelho do espectro pode ser um sinal de intercalação. Dessa forma, a partir da Figura 4 observou-se que ao adicionar 2,5 vezes de excesso do ctDNA em relação ao composto, ocorreu uma diminuição do sinal de absorvância, caracterizando um efeito hipocrômico, demonstrando que o composto ACS-Az01 se ligou na parte externa da

hélice. Entretanto, com a adição de maiores excessos (5 e 10 vezes), ocorreu um aumento do sinal de absorvância, denominado efeito hiperacrômico e um desvio para o vermelho ($\Delta\lambda = 3-8$ nm), que caracteriza um efeito batocrômico (Tabela 2), demonstrando que o composto ACS-Az01 foi inserido entre os pares de bases de DNA (intercalação). Assim, podemos inferir que a partir da adição de excessos diferentes de DNA, os compostos avaliados podem mudar seu modo de ligação com a biomolécula.

Figura 4- Espectro de absorção do composto ACS-Az01 (10 μM) e ACS-AZ01-ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Tampão fosfato) a 25 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

De acordo com informações prévias em trabalhos anteriores (Capítulos 1 e 3), o mecanismo de *quenching* pode ser determinado através da análise dos valores de absorvância do complexo formado e da soma entre os valores de absorvância do composto e do ctDNA. Nesse contexto, através da tabela 2 pode-se observar que o valor de ΔA foi diferente de zero, sugerindo que o mecanismo de *quenching* preferencial é estático, havendo formação de complexo supramolecular entre os compostos avaliados e o ctDNA (WU, et al., 2011).

Tabela 2 - Parâmetros de ligação por UV-Vis e valores de absorvância para os derivados de acridina avaliados (10 μM), ctDNA (100 μM) e composto-ctDNA. Condição: pH = 7,4 (tampão fosfato) a 25 °C.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$, nm	A_{composto}	A_{ctDNA}	A_{complexo}	ΔA
ACS-Az	472	475	3	0,288	0,000	0,296	+ 0,008
ACS-Az01	472	477	5	0,294	0,002	0,198	- 0,094
ACS-Az04	472	480	8	0,219	0,001	0,254	+ 0,034
ACS-Az05	472	476	4	0,203	0,001	0,272	+ 0,068

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

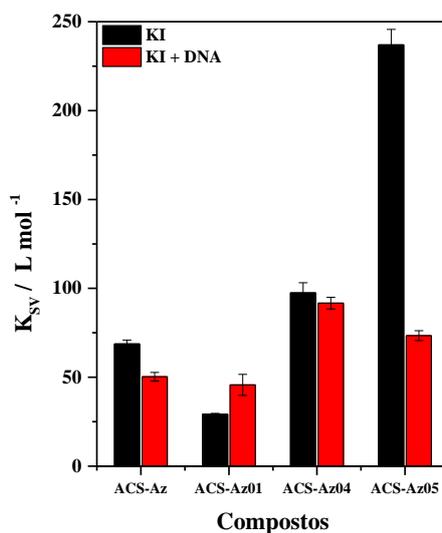
5.3.4 Avaliação do modo de ligação composto-ctDNA

O modo de ligação entre os compostos avaliados com ctDNA foi analisado avaliando o efeito de *quenching* do KI e competição com acridina orange, uma vez que as moléculas avaliadas são derivadas de acridinas (REHMAN, et al., 2015a; ZHANG, et al., 2012).

5.3.4.1 Ensaio iodeto de potássio (KI)

Como descrito anteriormente, o ensaio com iodeto de potássio é utilizado para avaliar o modo de ligação entre os compostos e o DNA, uma vez que é capaz de promover *quenching* dinâmico em moléculas fluorescentes, caso as mesmas estejam acessíveis. Para esse estudo a constante de Stern Volmer foi calculada de acordo com a equação (3), onde [Q] equivale a concentração do iodeto de potássio. A figura 5 apresenta os resultados para essa avaliação.

Figura 5- Valores de K_{SV} das acridinas (5,0 μM) por meio do *quenching* do KI na ausência e presença de ctDNA (50 μM). Condição: pH = 7,4 (tampão fosfato) a 25 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nota-se a partir da Figura 5 que os valores de K_{SV} para as acridinas ACS-Az, ACS-Az04 e ACS-Az05 foram sistematicamente menores na presença de ctDNA, indicando que a molécula está protegida e o íon iodeto não teve acesso a mesma, o que leva a inferir que o modo de ligação dessas moléculas com o ctDNA ocorre preferencialmente via intercalação (SAVARIZ, et al., 2014; REHMAN, et al., 2015a). Entretanto, para a acridina ACS-Az01 obteve-se um resultado diferente do esperado, ou seja, o valor da constante de Stern-Volmer foi maior na presença do ctDNA. Assim, para confirmar se esse composto realmente interage via outro mecanismo, realizou-se o experimento de transferência de energia por contato para essa molécula.

5.3.4.2 Transferência de energia por contato

Este método é baseado na transferência de energia de uma molécula doadora para uma receptora, e é utilizado para prever com maior confiabilidade o modo de ligação de moléculas que interagem via *groove* menor e que em alguns ensaios se comportam como intercalantes, e vice-versa. Apesar de existirem critérios bem estabelecidos para distinguir entre intercalação e *groove*, essas controvérsias podem surgir (SUH; OH; CHAIRES, 2001).

Nesse contexto, o método para avaliar a transferência de energia das bases do DNA para o ligante é indicado pela seguinte expressão:

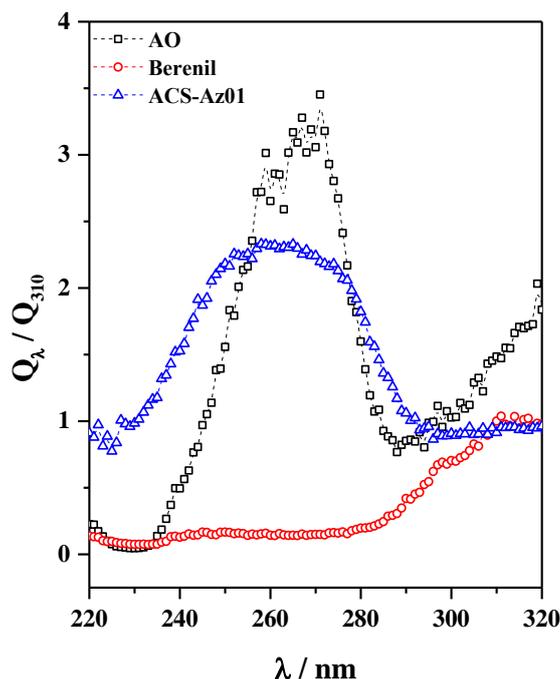
$$\frac{Q_{\lambda}}{Q_{310}} = \left(\frac{F_{\lambda} \varepsilon_{310}}{F_{310} \varepsilon_{\lambda}} \right)_{\text{ligado}} \left(\frac{F_{310} \varepsilon_{\lambda}}{F_{\lambda} \varepsilon_{310}} \right)_{\text{livre}} \quad (\text{Equação 14})$$

onde F e ε correspondem a intensidade de fluorescência medida e o coeficiente de extinção molar em um dado comprimento de onda (λ) e em 310 nm, respectivamente. Q refere-se à eficiência quântica. O comprimento de onda 310 nm, foi escolhido para normalização em virtude da absorvância do DNA ser desprezível (SUH; CHAIRES, 1995).

A transferência de energia a partir das bases do ácido nucleico para o ligante provoca um aumento na intensidade de fluorescência do ligante se este estiver intercalado ao DNA. A transferência de energia de uma molécula doadora para uma receptora depende da sobreposição espectral, distância e orientação entre as moléculas. Para um fluoróforo intercalado, a distância é praticamente negligenciável, uma vez que o fluoróforo encontra-se entre os pares de bases do DNA, e o plano da molécula intercalada é praticamente sobreposto às bases do DNA. Conseqüentemente, a energia pode ser transferida facilmente. Entretanto, quando o composto está ligado nos sulcos da biomolécula (*groove*), a eficiência da transferência não é grande, devido a maior distância entre os pares de bases e o ligante, bem como a orientação dos dipolos que não favorece essa transferência (SUH; CHAIRES, 1995; HYUN, et al., 1997; VIOLA, et al., 2000).

Assim, para esse ensaio utilizou-se dois compostos que possuem modo de ligação bem estabelecido, a acridina orange (AO) e o berenil, que se ligam via intercalação e *groove* respectivamente, para comparar os perfis espectrais obtidos com o ligante em estudo (no caso ACS-Az01). A Figura 6 mostra os resultados referentes a essa avaliação.

Figura 6- Resultados referentes ao ensaio de transferência de energia por contato.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

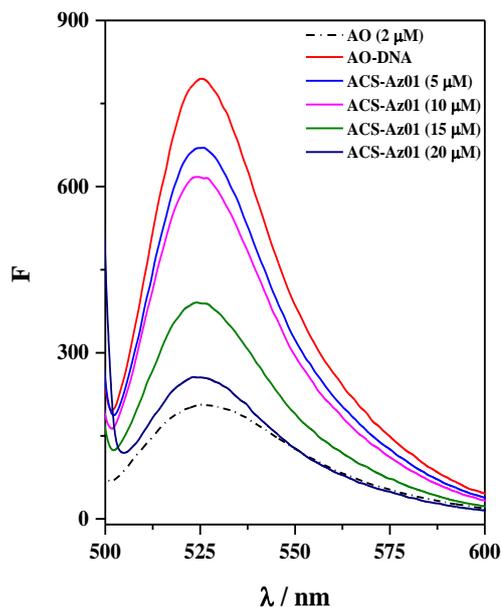
De acordo com a Figura 6, foi observado que a acridina orange ligada ao ctDNA apresenta excitação em torno de 260 nm, que corresponde ao comprimento de onda no qual o valor da absorvância dos pares de bases do DNA é máximo, indicando a forte transferência de energia do ctDNA para o ligante. Enquanto para o berenil foi verificado que a relação Q_λ/Q_{310} é menor que 1, indicando que praticamente não houve transferência de energia (SUH; CHAIRES, 1995; HYUN, et al., 1997; VIOLA, et al., 2000). No caso do derivado ACS-Az01, foi observado pelo perfil espectral, tendência similar a acridina orange, indicando que o modo de ligação preferencial dessa molécula com o DNA é via intercalação.

Portanto, esses dados evidenciam que o ensaio com o iodeto de potássio está sujeito a limitações e que em alguns casos, são necessários experimentos adicionais para avaliar o modo de ligação de alguns compostos com o DNA.

5.3.4.3 Ensaio de competição com acridina orange (AO)

Adicionalmente, para confirmar que os compostos avaliados realmente interagem por intercalação foi realizado um ensaio de competição com acridina orange. A acridina orange (AO) na forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, contudo quando a mesma intercala com DNA, ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7- Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema AO-DNA por competição do composto ACS-Az01. Concentração da AO e ctDNA foram 2,0 e 6,0 μM , respectivamente.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

A presença de um ligante com mesmo modo de ligação ao DNA no sistema pode levar ao deslocamento da AO intercalada, e por consequência conduzir a uma diminuição na intensidade de fluorescência, pois parte da AO estaria na forma livre (não intercalada) (ZHANG, et al., 2012). Dessa forma, nos estudos realizados empregou-se um excesso de até 10 vezes em relação à quantidade de acridina orange inicial, e observou-se que a intensidade de emissão do complexo AO-DNA diminuía à medida que a concentração dos compostos aumentava. Foram obtidas reduções de 43,8 a 87,3 % do sinal, como apresentado na Tabela 3. Nota-se que a ordem de magnitude quanto ao decréscimo do sinal está relacionada à capacidade de deslocar a AO do DNA. Desta forma, pode-se concluir que o modo de ligação dos compostos avaliados ocorre de forma similar ao da acridina orange, corroborando com os resultados da avaliação no ensaio com KI e transferência de energia por contato, reforçando a proposta da interação dos derivados de acridinas preferencialmente via intercalação.

Tabela 3- Parâmetros do equilíbrio de competição AO-DNA com os derivados de acridinas (20 μM) avaliados (30 °C).

Compostos	AO-DNA
	Decréscimo do sinal de fluorescência, %
ACS-Az	43,8
ACS-Az01	87,3
ACS-Az04	75,9
ACS-Az05	85,4

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

5.3.5 Estudos por *docking* molecular

Nesses experimentos, inicialmente a estrutura de cada composto foi desenhada e submetida à otimização de energia. Estas foram então importadas para a estrutura do DNA para fins de docagem. As conformações mais favoráveis dos derivados de acridinas obtidas por *docking* foram analisadas. Os valores negativos das energias de ligação, na faixa de -7,2 a -9,5 kcal mol⁻¹, indicaram um maior potencial de ligação dos compostos com o DNA através de interações não covalentes, sendo consistente com os estudos espectroscópicos e ensaios biológicos (Tabela 4).

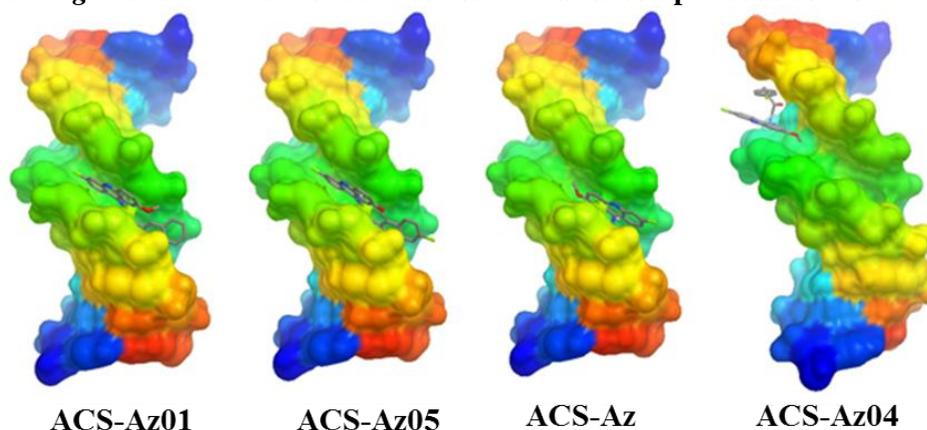
Tabela 4- Energias de ligação dos derivados de acridinas com DNA.

Compostos	Energia de afinidade (kcal mol ⁻¹)
ACS-Az	-7,7
ACS-Az01	-9,5
ACS-Az04	-7,2
ACS-Az05	-8,7

Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

Para todos os compostos avaliados por *docking*, observaram-se algumas alterações conformacionais nas moléculas após ligação com o DNA, e uma preferência para a intercalação no *groove* menor pode ser observada (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados para outros derivados de acridinas, onde o modo de intercalação no *groove* menor foi preferido em relação à intercalação no *groove* maior e intercalação clássica (JANOVEC, et al., 2011; GHOSH, et al., 2010).

Figura 8- Docking das estruturas moleculares dos derivados complexadas com o DNA.

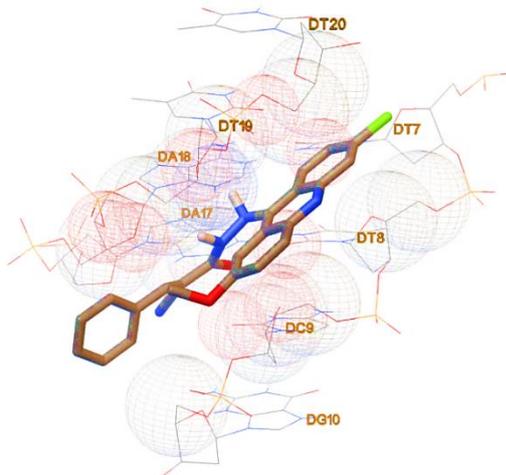


Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

Neste modelo, para os dois compostos que exibiram melhores valores das energias de ligação, no caso ACS-Az01 e ACS-Az05, os resíduos de DNA T7, T8, C9 e G10, A17, A18, T19, T20 e T21 desempenharam um papel importante no sítio de ligação, resultando em

contato próximo com a superfície das moléculas através de interações hidrofóbicas (Figura 9, para ACS-Az01). O derivado sem grupo benzilideno (ACS-Az) apresentou baixa interação com o DNA em relação às acridinas substituídas (Tabela 4), entretanto o derivado ACS-Az04, substituído com grupo 4-fluoro-benzilideno apresentou alteração no sítio de intercalação em relação aos outros compostos, tendo a menor energia associada ao processo de interação.

Figura 9- Docking molecular do composto ACS-Az01 mostrando as interações hidrofóbicas (esferas cinzas) com DNA.



Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

Dessa forma, foi possível observar que o grupo fenil contribui de forma significativa para a interação dos compostos ACS-Az01 e ACS-Az05, visto que a acridina ACS-Az não possui esse grupo e apresenta uma menor constante. Entretanto, somente para o derivado ACS-Az04 a presença do flúor ligado ao anel aromático levou a uma diminuição do valor da constante de ligação, visto que nesse caso, a presença do flúor alterou a conformação em relação ao núcleo das acridinas, impedindo a aproximação de forma mais efetiva desse composto ao DNA.

Assim, estudos realizados por *docking* molecular foram consistentes com os resultados espectroscópicos, e, portanto, reforçam a proposta de que a interação dos derivados de acridinas com o DNA é o mecanismo preferencial de ação biológica destes compostos.

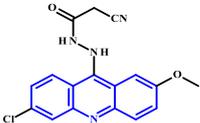
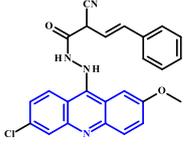
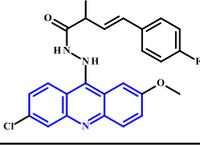
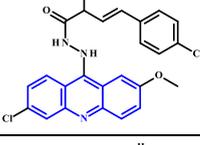
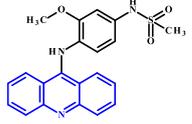
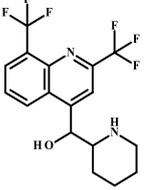
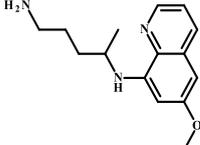
5.3.6 Análise de correlação

Os derivados de acridinas avaliados neste trabalho foram testados quanto à atividade antimalárica frente à linhagem de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2) e a atividade citotóxica foi analisada utilizando células hospedeiras de hepatoma humano (HepG2), uma vez que o fígado é um dos principais órgãos envolvidos no metabolismo desses fármacos. Além disso, a partir da razão entre a dose tóxica para 50% das células e sua atividade anti-*P.*

falciparum (IC₅₀¹), calculou-se o índice de seletividade que representa a relação entre a dose ativa e a dose tóxica.

Nos ensaios biológicos, utilizou-se compostos descritos como padrão na literatura, como a amsacrina, que possui similaridade estrutural com as acridinas avaliadas neste trabalho; a mefloquina e primaquina que são conhecidas como fármacos antimaláricos. Os resultados referentes a esses ensaios são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5- Resultados dos ensaios biológicos das acridinas avaliadas frente à linhagem de *P. falciparum* W2 e controle positivo HepG2.

Compostos	Estruturas	IC ₅₀ ± sd (µM)		Índice de seletividade (IS)
		Linhagem <i>P. falciparum</i> W2	Células hospedeiras HepG2	
ACS-Az		2,80 ± 0,80	73,5 ± 2,8	26
ACS-Az01		0,90 ± 0,80	80,7 ± 0,5	90
ACS-Az04		3,20 ± 0,20	> 200	15
ACS-Az05		2,40 ± 1,10	> 200	-
Amsacrina		0,80 ± 0,10	5,20 ± 0,60	7
Mefloquina		0,04 ± 0,01	11,81 ± 0,28	295
Primaquina		1,70 ± 0,10	82,9 ± 0,2	49

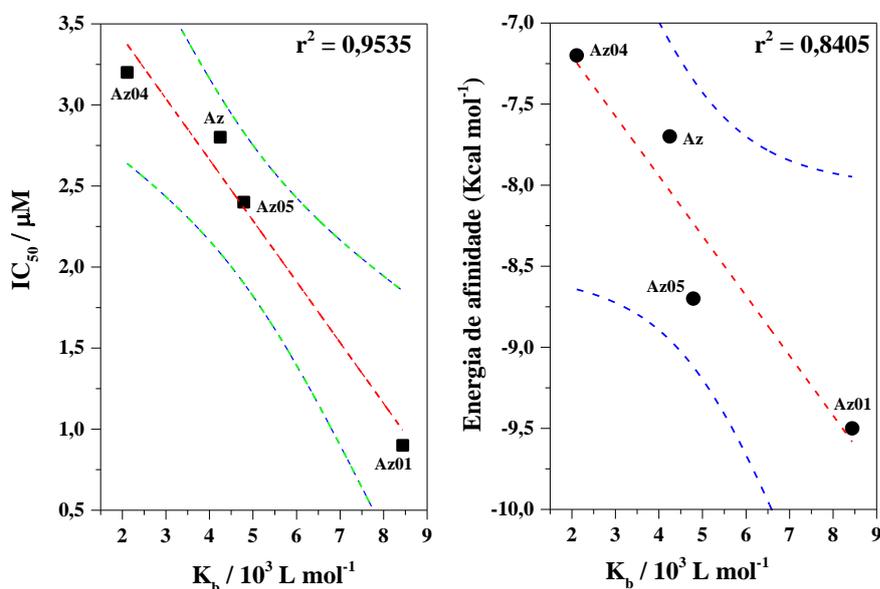
Fonte: elaborado pelo professor Thiago Mendonça de Aquino, 2016.

¹ Concentração mínima do fármaco capaz de produzir citotoxicidade de 50% da cultura celular (MENSAH, A. A., et al., 2014).

Dessa forma, a partir dos valores das constantes de ligação (K_b) foi avaliada se existia correlação linear (r^2 , coeficiente de determinação) com os valores de IC_{50} e as energias de afinidade obtidas através de *docking* molecular. Esta estratégia foi empregada, de forma similar aos trabalhos anteriores visando observar se estas variáveis independentes estão relacionadas e, desta forma, se o mecanismo de ação dos compostos avaliados pode ou não, está associado à interação com DNA.

A Figura 10 apresenta os coeficientes de determinação obtidos para os compostos avaliados frente à linhagem celular de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2) com um intervalo de confiança de 95%.

Figura 10- Gráfico de correlação linear do IC_{50} (μM) vs K_b (L mol^{-1}) e energia de afinidade (kcal mol^{-1}) vs K_b (L mol^{-1}), respectivamente, a 95% de intervalo de confiança (linhas verdes e azuis). A sigla ACS foi suprimida para facilitar a observação dos compostos nos gráficos abaixo.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

De acordo com a Figura 10 observa-se que foi possível relacionar a atividade antimalárica empregando todos os compostos avaliados, com um coeficiente de determinação de 0,9535; bem como uma boa correlação com os valores das energias de afinidade dos compostos avaliados, onde $r^2 = 0,8405$. Assim, de acordo com os resultados obteve-se uma tendência inversa, sendo que quanto maior o valor da constante de interação com DNA menor o valor de IC_{50} e da energia de interação, e desta forma, mais ativos foram os compostos frente ao *P. falciparum*.

Adicionalmente, a partir da Tabela 5 observou-se que o composto que apresentou maior constante de ligação com o ctDNA (ACS-Az01), obteve valores de IC_{50} (para a linhagem W2) próximos ao da amsacrina, devido a similaridade estrutural bem como a

magnitude da interação entre a amsacrina e o DNA, onde o valor da constante de ligação (K_b) foi de $1,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (JANGIR, et al., 2012). Do mesmo modo, a acridina ACS-Az01 demonstrou uma atividade citotóxica semelhante à primaquina, evidenciando que esse composto possui uma boa atividade antimalárica.

De acordo com Bézivin e colaboradores (2003), quanto maior o índice de seletividade, mais seguro e conseqüentemente menos tóxico é o composto avaliado. Dessa forma, pode-se verificar que as moléculas estudadas neste trabalho possuem IS comparáveis ao da primaquina e amsacrina, com destaque para o ACS-Az01 que mostrou um IS maior que o da primaquina (Tabela 5). Esse dado é muito promissor, uma vez que a primaquina foi considerada por muito tempo como um fármaco ideal, principalmente devido a sua baixa toxicidade. Além disso, também foi possível observar que a acridina ACS-Az01 apresentou atividade citotóxica (IC_{50} -HepG2) similar a primaquina, confirmando os dados obtidos anteriormente.

Embora os resultados encontrados não sejam semelhantes aos da mefloquina, vale mencionar que esses dados foram obtidos a partir de ensaios preliminares, sugerindo que modificações estruturais para as acridinas avaliadas pode aumentar o índice de seletividade para garantir uma maior segurança e menor toxicidade desses compostos frente à atividade antimalárica.

Portanto, os resultados da correlação confirmam os dados espectroscópicos, indicando que os derivados de acridinas avaliados neste estudo devem possuir como principal mecanismo de ação a interação com o DNA.

5.4 Conclusão

Os derivados de acridinas avaliados neste trabalho apresentaram interação significativa com o modelo de DNA empregado, havendo a formação de um complexo supramolecular entre essas moléculas e o ctDNA.

Assim, os valores de constantes de ligação variaram de 2,09 a $7,76 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, seguindo a ordem (ACS): Az01 > Az05 > Az > Az04. Estes resultados corroboraram com os valores das energias de afinidade obtidos por meio dos estudos de *docking* molecular. Além disso, observou-se que o composto que apresentou maior constante de ligação com o ctDNA (ACS-Az01), obteve valores de IC_{50} (para a linhagem W2) próximos ao da amsacrina e o valor da sua atividade citotóxica semelhante ao da primaquina, evidenciando que esse composto possui uma boa atividade antimalárica.

A partir dos ensaios empregando iodeto de potássio, competição com acridina orange e estudos de transferência de energia por contato, foi possível classificar como intercalação o modo de interação preferencial ctDNA-ligante. Na análise de correlação obteve-se uma tendência inversa, sendo que quanto maior o valor da constante de interação com ctDNA menor o valor de IC_{50} e da energia de afinidade, e desta forma, mais ativos foram os compostos para a linhagem celular avaliada. Além disso, verificou-se que todos os compostos avaliados são relacionados com a atividade antimalárica, com um coeficiente de determinação de 0,9535; bem como uma boa correlação com os valores das energias de ligação obtidas por *docking*, sendo $r^2 = 0,8404$.

Assim, a partir do conjunto de resultados obtidos por diferentes técnicas foi possível inferir que o mecanismo preferencial de ação das acridinas avaliadas frente à atividade antimalárica possa estar associado a interação com DNA como principal alvo biológico.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. O., et al. Parallel synthesis of 9-aminoacridines and their evaluation against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, v. 14, p. 334–343, Out., 2006.
- AUPARAKKITANON, S., et al. Antimalarial 9-Anilinoacridine Compounds Directed at Hematin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Nova Zelândia, v. 47, p. 3708–3712, Dez., 2003.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, In press, 2015.
- BELMONT, P., et al. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, França, v. 7, p. 139-169, 2007.
- BÉZIVIN, C., et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, França, v.10, p. 499–503, 2003.
- CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P., et al. Inhibitory effects of 9-anilinoacridines on *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Tropical Medicine and International Health**, Tailândia, v. 6, p. 42-45, Jan., 2001.
- CHI, Z., et al. Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA. **Journal of Hazardous Materials**, China, v.175, p. 274–278, Out., 2010.
- CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, Polônia, v. 63, p. 305-336, 2011.
- DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, França, v. 7, p. 1703-1724, 2001.
- DENNY, W.A. Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, Nova Zelândia, v. 9, p. 1655-1665, 2002.
- GAMAGE, S. A., et al. Synthesis and in Vitro Evaluation of 9-Anilino-3,6- diaminoacridine Active Against a Multidrug-Resistant Strain of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal Medicinal Chemistry**, Tailândia, v. 37, p. 1486-1494, Dez., 1994.
- GAO, C., et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, China, v. 23, p. 1800–1807, Fev., 2015.
- GHOSH, R., et al. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. **European Biophysics Journal**, Índia, v. 39, p.1243–1249, Fev., 2010.

- GIORGIO, C. D., et al., Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **Food and Chemical Toxicology**, França, v. 49, p. 2773–2779, Jul., 2011.
- HYUN, K., et al. Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? **Biochimica et Biophysica Acta**, Coréia do Sul, v. 1334, p. 312–316, Out., 1997.
- JANGIR, D. K., et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 114, p.38–43, Mai., 2012.
- JANOCKOVA, J., et al. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. **European Journal of pharmaceutical Sciences**, República Eslovaca, v. 76, p.192–202, Mai., 2015.
- JANOVEC, L., et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, República Eslovaca, v. 19, p. 1790–1801, Jan., 2011.
- JANOVEC, L., et al. Synthesis, DNA Interaction, and Cytotoxic Activity of a Novel Proflavine-Dithiazolidinone Pharmacophore. **Bioconjugate Chemistry**, República Eslováquia, v. 18, p. 93-100, Set., 2007.
- JOSEPH J., et al. Tuning of Intercalation and Electron-Transfer Processes between DNA and Acridinium Derivatives through Steric Effects. **Bioconjugate Chemistry**, Geórgia, v. 15, p. 1230-1235, Set., 2004.
- KUMAR R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: a versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Índia, v.69, p.3-9, 2012.
- KWON, J. H., et al. Effect of Number and Location of Amine Groups on the Thermodynamic Parameters on the Acridine Derivatives to DNA. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Coréia, v. 34, p. 810-814, Dez., 2013.
- MENSAH, A. A., et al. Novel HDAC inhibitors exhibit pre-clinical efficacy in lymphoma models and point to the importance of *CDKN1A* expression levels in mediating their anti-tumor response. **Oncotarget**, Itália, v. 6, p. 5059-5071, Dez., 2014.
- PATEL, M. M.; MALI, M. D.; PATEL, S. K. Bernthsen synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Índia, v. 20, p. 6324-6326, Jun., 2010.
- PLSIKOVA, J., et al. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, República Eslovaca, v. 57, p. 283-295, Set., 2012.
- POMMIER, Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition. **Chemical Reviews**, Estados Unidos, v. 109, p. 2894-2902, Jul., 2009.

REHMAN, S.U., et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.566, p.7–14, Jan., 2015a.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.

SONDHI, S. M. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 45, p. 555-563, Nov., 2010.

SUH, D.; CHAIRES, J. B. Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, v. 3, p. 723-728, 1995.

SUH, D.; OH, Y.; CHAIRES, J. B. Determining the binding mode of DNA sequence specific compounds. **Process Biochemistry**, Coreia do Sul, v. 37, p. 521–525, Jun., 2001.

TOMAR, V., et al. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 45, p. 745–751, Nov., 2010.

VIOLA, G., et al. Interactions between DNA and benzo- and tetrahydrobenzofurocoumarins: thermodynamic and molecular modeling studies. **II Farmaco**, Espanha, v. 55, p.276–286, Marc., 2000.

WU, M., et al. Synthesis of a novel fluorescent probe based on acridine skeleton used for sensitive determination of DNA. **Talanta**, China, v.75, p. 995–1001, Jan., 2008.

WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v.79, p.1202– 1209, Abr., 2011.

ZHANG, S., et al. Investigation on the interaction between luteolin and calf thymus DNA by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 97, p. 521–525, Jul., 2012.

6 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho possibilitou avaliar a interação de forma quantitativa de três classes de compostos sintéticos com o ctDNA, visando propor o possível mecanismo de ação dessas moléculas. Dessa forma, em relação à avaliação da interação entre os compostos estudados e o ctDNA, as técnicas espectroscópicas utilizadas (UV-Vis e fluorescência molecular), bem como estudos por *docking* molecular, mostraram-se eficientes, uma vez que permitiram determinar as constantes, modo de ligação, estequiometria, parâmetros termodinâmicos e energia de ligação quanto ao complexo supramolecular formado.

Dessa forma, os ensaios envolvendo iodeto de potássio e competição com brometo de etídio e acridina orange, foram de grande importância, uma vez que foi possível avaliar o modo de ligação DNA-ligante, sugerindo que os derivados β -carbolínicos e acridinas interagem preferencialmente via intercalação, enquanto as aldiminas ligam-se preponderantemente nos sulcos (*groove*) da biomolécula.

Uma vez determinado os valores de K_b foi possível estabelecer correlação linear com os valores das atividades biológicas dos compostos avaliados, onde observou-se uma tendência linear inversa para os derivados β -carbolínicos, acridinas e algumas aldiminas (somente hidroxiladas). Enquanto para outra classe de aldiminas (contendo grupo nitro) foi observada tendência linear direta.

De modo geral, os resultados sugeriram que o mecanismo de ação dos compostos avaliados, possivelmente, está associado à interação com o DNA como principal alvo biológico. Portanto, as estruturas desses compostos podem ser utilizadas como modelos para a concepção de novos medicamentos contra o câncer e malária.

7 PERSPECTIVAS

- i)* Avaliar a interação de outras classes de compostos com o ctDNA a partir de colaborações (alcaloides β -carbolínicos, cumarinas, xantenonas, benzotiazóis, benzimidazóis, entre outras);
- ii)* Propor alterações nas estruturas moleculares das classes de compostos avaliados visando ampliar a interação com o DNA, bem como as atividades biológicas destas moléculas;
- iii)* Avaliar a interação das três classes de compostos estudados com a Albumina do Soro Humano (HSA) estabelecendo os principais parâmetros de interação;
- iv)* Realizar o encapsulamento dos compostos avaliados mais ativos com β -ciclodextrina e/ou (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina visando aumentar a solubilidade em água. Avaliar a formação do complexo com as ciclodextrinas através de técnicas espectroscópicas (UV-Vis e fluorescência molecular), além de técnicas de RMN ^1H , como DOSY, ROESY e calcular as constantes de associação aparente.

8 ARTIGOS

8.1 Publicados

Bioorganic & Medicinal Chemistry 22 (2014) 6867–6875



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases



Franciele Cristina Savariz^a, Mary Ann Foglio^b, Ana Lucia T. Goes Ruiz^b, Willian Ferreira da Costa^a, Marina de Magalhães Silva^c, Josué Carinhonha Caldas Santos^c, Isis Martins Figueiredo^c, Emerson Meyer^a, João Ernesto de Carvalho^b, Maria Helena Sarragiotto^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP: 87020-900 Maringá, PR, Brazil

^bCentro Fluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas, 6171, CEP: 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^cInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, CEP: 57072-970 Maceió, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2014

Revised 15 October 2014

Accepted 23 October 2014

Available online 29 October 2014

Keywords:

 β -Carboline

2-Oxo-1,3,4-oxadiazole

Mannich bases

Antitumor activity

Synthesis

ctDNA interaction

ABSTRACT

A series of novel 1-(substituted phenyl)-3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines (**4a–e**) and the corresponding Mannich bases **5–9(a–c)** were synthesized and evaluated for their in vitro antitumor activity against seven human cancer cell lines. Compounds of **4a–e** series showed a broad spectrum of antitumor activity, with GI_{50} values lower than 15 μ M for five cell lines. The derivative **4b**, having the *N,N*-dimethylaminophenyl group at C-1, displayed the highest activity with GI_{50} in the range of 0.67–3.20 μ M. A high selectivity and potent activity were observed for some Mannich bases, particularly towards resistant ovarian (NCI-ADR/RES) cell lines (**5a**, **5b**, **6a**, **6c** and **9b**), and ovarian (OVCAR-03) cell lines (**5b**, **6a**, **6c**, **9a**, **9b** and **9c**). In addition, the interaction of compound **4b** with DNA was investigated by using UV and fluorescence spectroscopic analysis. These studies indicated that **4b** interact with ctDNA by intercalation binding.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The β -carboline nucleus is present in many synthetic and naturally occurring compounds, displaying a large spectrum of important pharmacological and biological properties.^{1–6} It is worth mentioning the significant antitumor activity of β -carboline derivatives demonstrated in several studies, which have focused on the design, synthesis and structure–activity relationship (SAR), as well as on their anticancer action mode.^{7–13}

β -Carbolines can exert the antitumor activity through multiple mechanisms, such as DNA intercalation,^{10–12} DNA binding,^{13–15} or DNA synthesis inhibition.¹⁶ Additionally, some β -carboline derivatives are capable of inhibiting Topoisomerases I and II,^{17,18} I κ B kinase (IKK),¹⁹ cyclin-dependent kinases (CDKs),²⁰ polo-like kinase (PLK1)²¹ and kinesin-like protein Eg5.²²

SAR studies on the chemistry and antitumor activity of β -carboline alkaloids report that the introduction of appropriate substituents into 1-, 3- and 9-positions of β -carboline ring can result in more potent compounds with reduced toxicity and neurotoxic effects.^{7–13} In our previous work,^{23–25} we demonstrated that

derivatives bearing a phenyl group appropriately substituted at position-1, and different substituents at position-3 of the β -carboline nucleus showed potent antitumor activity. Among the substituents at C-3, the 2-thioxo-1,3,4-oxadiazolyl group was a suitable pharmacophoric group, giving rise to 1-(substituted phenyl)-3-(2-thioxo-1,3,4-oxadiazolyl) β -carbolines (**1**, Fig. 1) with significant antitumor activity.²³ In addition, we found that the Mannich bases (**2**, Fig. 1), from the most active compounds of series **1**, displayed even higher antitumor activity.²⁵

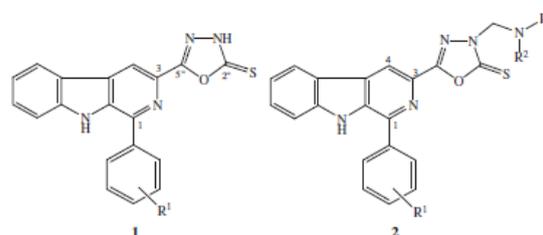


Figure 1. General structures of 1-(substituted phenyl)-3-(2-thioxo-1,3,4-oxadiazolyl)- β -carbolines (**1**) and the corresponding Mannich bases (**2**).

* Corresponding author. Tel.: +55 44 3011 5377; fax: +55 44 3261 4125.
E-mail address: mhsarragiotto@uem.br (M.H. Sarragiotto).



Evaluation of different fractions of the organic matter of peat on tetracycline retention in environmental conditions: in vitro studies

Shenia Oliveira Souza¹ · Marina de Magalhães Silva¹ ·
 Josué Carinhanha Caldas Santos¹ · Luciana Camargo de Oliveira² ·
 Janaina Braga do Carmo² · Wander Gustavo Botero¹

Received: 22 September 2015 / Accepted: 15 January 2016
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose Due to the modernization of the agro-industrial sector, compounds with different toxicity and effects on human health and animal have been used and consequently affecting the environment. Among them, tetracycline (TC) stands out as one of the antibiotics most commonly used worldwide. This study evaluated the TC interaction with different fractions of tal analysis, spectroscopic analysis (E_4/E_6), and nuclear magnetic resonance of carbon 13 (NMR ^{13}C), and the interaction between TC and different fractions of organic matter was made by fluorescence spectrometry. We used the tangential ultra-filtration system for determining the complexation capability of humic substances (HSs), fulvic acids (FA), humic acids (HA), and humin (HUM) from peat with TC. Finally, we evaluated sorption kinetic experiments between TC and peat *in natura*.

Results and discussion The peat samples, humic substances, FAs, HAs, and HUM were characterized by organic matter (OM), atomic ratio (H/C and C/O) calculated from elemental analysis data, functional groups quantified by NMR ^{13}C data, and E_4/E_6 ratio, and the results show significant differences in the structural characteristics of the fractions of OM influenced by the type of microorganisms and environmental factors as model to describe the system under consideration using the Freundlich model.

Conclusions The results showed that the different fractions of the OM extracted from peat show different contributions that affect the bioavailability of contaminants to the environment.

Keywords Humic substances · Organic matter · Peat · Spectroscopic analysis · Tetracycline

Responsible editor: Dong-Mei Zhou

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11368-016-1364-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Wander Gustavo Botero
 wanderbotero@gmail.com

¹ Federal University of Alagoas, Post-Graduate Program in Chemistry and Biotechnology, 57309-005 Alagoas, Brazil

² Federal University of São Carlos, Sorocaba Campus, Post-Graduate Program in Biotechnology and Environmental Monitoring, 13052-780 São Paulo, Brazil

1 Introduction

The composition of the organic matter (OM) depends on the ambient source (Aiken and Costaris 1995), generated from a number of organic compounds present in natural waters, soils, and sediments such as carbohydrates, proteins, and amino acids subsequently forming compounds with high molecular weights, such as humic substances (HSs) (Rodríguez et al. 2014). In soils, organic compounds can be found in two forms, nonhumified and humified (Andreas and Zhang 2014). In context, humified organic compounds are known as humic substances. The humic substances are divided into three fractions: (1) humin (HUM), fraction of humic substance not



Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking

Marina M. Silva,^a Franciele C. Savariz,^b Edeildo F. Silva-Júnior,^a Thiago M. de Aquino,^a Maria Helena Sarragiotto,^b Josué C. C. Santos^a and Isis M. Figueiredo^{*a}

^aInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá-PR, Brazil

Quantitative interaction of twelve β -carboline derivatives with calf thymus deoxyribonucleic acid (ctDNA) using spectroscopic techniques was evaluated. The values of the binding constants (K_b) obtained for the complexes formed with the ctDNA ranged from 3.30×10^2 to 1.82×10^6 mol L⁻¹, being the β -carbolines with the *N,N*-dimethylaminophenyl group at position 1 the ones which presented the highest K_b values. The binding mode between the β -carbolines evaluated and ctDNA was proposed from the KI assay, competition with ethidium bromide, and DNA thermal denaturation profile (T_m), where it was possible to infer that the evaluated alkaloids interact with ctDNA preferably *via* intercalation. Additionally, the correlation of K_b values obtained with the IC₅₀ of seven human cancer cell lines was carried out. From this study, it was possible to observe a linear relation among most of the evaluated derivatives, obtaining r^2 values from 0.5360 to 0.9600. In addition, *in silico* molecular docking was performed to corroborate the experimental results.

Keywords: β -carboline derivatives, ctDNA interaction, molecular fluorescence, anti-tumor activity

Introduction

The β -carboline alkaloids are a large group of natural and synthetic indole alkaloids that possess a common tricyclic pyrido[3,4-*b*]indole ring structure, and can be categorized according to the saturation of their *N*-containing six-membered ring.¹ Studies demonstrate that these alkaloids have several pharmacological actions, among them, anticonvulsant, anti-viral, anti-tumor, anti-proliferative and anti-microbial activity.¹⁻⁵ Moreover, β -carbolines act as deoxyribonucleic acid (DNA) intercalating agents and are able to inhibit the topoisomerases I and II enzymes,^{6,8} which are responsible for regulating processes such as transcription, replication and DNA recombination.^{9,10}

Due to different activities demonstrated by this class of compounds, we have synthesized and evaluated the biological activities of several derivatives with different substituents at positions 1 and 3 of the β -carboline nucleus. Scheme 1 shows a compilation of some of our works

highlighting compounds with activity against different *in vitro* assays.¹¹⁻¹⁷

In a recent study from our group,¹⁶ we showed that a series of 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(2-oxo-3-alkylaminomethyl-1,3,4-oxadiazolyl)- β -carboline derivatives presented *in vitro* antiproliferative activity against cancer cell lines, being more active for resistant ovarian (NCI-ADR/RES) and breast (MCF7) cancer cell lines. Investigation of the DNA interaction mode for the most active compound, 1-(4-*N,N*-dimethylaminophenyl)-3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carboline, showed a strong interaction with DNA via intercalation, indicating that its action mechanism may be associated with this process.

In this context, some studies have tried to establish the existence of the relationship between the binding constants (K_b) values with DNA and *in vitro* activity parameters,¹⁸⁻²⁰ to evaluate the action mechanism responsible for the biological activity. It is worth mentioning studies with guanidine derivatives with antimalarial activity that showed a correlation coefficient (Pearson's coefficient, r) equal to 0.9327 for the relationship between K_b and IC₅₀.¹⁸

*e-mail: figueiredo.isis@gmail.com

9 PREMIAÇÕES



Sociedade Brasileira de Química

38ª REUNIÃO ANUAL
DA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA

Águas de Lindóia - SP, 25 a 28 de maio de 2015

CERTIFICADO

Atestamos que o trabalho **“MED-020 - Estudos por espectrofluorimetria da interação de aldiminas com ctDNA e correlação com suas atividades antiproliferativas”**, de autoria de Marina M. Silva (PG), Cleiton M. da Silva (PG), Ângelo de Fátima (PQ), Josué C. C. Santos (PQ) e Isis M. Figueiredo (PQ), foi escolhido como um dos melhores painéis apresentados na Seção de QUÍMICA MEDICINAL, realizada durante a **38ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, em Águas de Lindóia - SP.

Luiz Fernando da Silva Jr
Secretário Geral da SBQ
Presidente da Comissão Organizadora da
38ª RASBQ

CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO

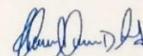
Certificamos que o trabalho intitulado

Avaliação da interação de acridinas com ctDNA e HSA: estudos espectroscópicos e correlação com atividade antimalárica

de autoria de

Marina M. Silva, Thamilla M. S. Maciel, Edeílido F. Silva-Júnior, Thiago M. de Aquino, Josué C. C. Santos e Isis M. Figueiredo

foi premiado como o melhor trabalho no **I WORKSHOP DO NORDESTE EM QUÍMICA MEDICINAL E DOENÇAS NEGLIGENCIADAS** na sua forma de **painel**



Thiago Aquino
Comissão Organizadora - UFAL

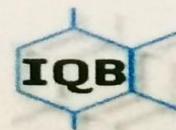
**I WORKSHOP DO NORDESTE
EM QUÍMICA MEDICINAL E
DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**



PPGCF



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS



IQB



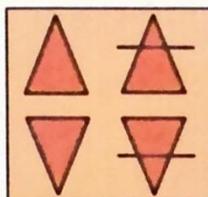
PPGQB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

09 a 10 de novembro de 2015
Maceió - AL



CERTIFICADO



**I Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia**

*Diagnóstico, desafios e perspectivas para o fortalecimento da pesquisa em
Química no Nordeste*

CERTIFICADO DE PREMIAÇÃO

Certificamos que a aluna de mestrado **Marina de Magalhães Silva** foi premiada com o trabalho intitulado “Avaliação da interação de derivados β -carbolínicos com ctDNA: estudos espectroscópicos e correlação com atividade biológica” no *I Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*, realizado entre os dias 7 e 10 de dezembro de 2015, no Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL – Maceió-AL.

Prof. Dr. Isis Martins Figueiredo

Comissão Organizadora

I Simpósio Nordestino de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia